

Untersuchungen der durch zelluläre Adhäsion vermittelten Chemoresistenz (CAM-DR) und der ihr zugrunde liegenden Signalmechanismen in MCF-7- Mammakarzinom- und MV3-Melanomzellen

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Bastian Jakubzig

aus Köln

Bonn, Juni 2019

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Gerd Bendas
2. Gutachter: PD Dr. Ganna Staal geb. Kalayda
Tag der Promotion: 10.10.2019
Erscheinungsjahr: 2019

Without the element of enjoyment, it is not worth trying to excel at anything.

Magnus Carlsen

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
2. Theorie	5
2.1. Grundlagen der untersuchten Krebserkrankungen	5
2.1.1. Mammakarzinom	5
2.1.2. Melanom	9
2.1.3. Zytostatika	12
2.2. Resistenzbildung im Kontext der Metastasierung	20
2.2.1. Konzept der <i>minimal residual disease</i>	20
2.2.2. Resistenzbildung	24
2.3. Integrine	26
2.3.1. Struktur	26
2.3.2. Organisation der Integrin Superfamilie	29
2.3.3. Die Extrazellulärmatrix	30
2.3.4. Therapeutische Relevanz der Integrine	32
2.4. Wnt-signaling	38
2.4.1. Aktives Wnt-signaling	38
2.4.2. Inaktives Wnt-signaling	40
2.4.3. Rolle des Wnt-signaling in Krebserkrankungen	41
2.4.4. E-Cadherin im Kontext von Wnt und EMT	43
2.5. MAPK-signaling	46
2.5.1. Das <i>cAMP response element binding protein</i> (CREB)	47
2.5.2. Rolle des MAPK-signaling in Krebserkrankungen	49
3. Zielsetzung der Arbeit	51
4. Material und Methoden	53
4.1. Verwendete Materialien	53
4.1.1. Chemikalien und Ausgangsstoffe	53
4.1.2. Hergestellte Reagenzien	58
4.1.3. Verbrauchsmaterialien	64
4.1.4. Geräte	65
4.1.5. Software	68
4.2. Zellkultur	69

4.2.1.	Zelllinien	69
4.2.2.	Lagerung	70
4.2.3.	Kultivierung	70
4.2.4.	Kryokonservierung	71
4.2.5.	Zellzahlbestimmung	71
4.2.6.	Mykoplasmentest	72
4.3.	Kollagen Beschichtung	72
4.3.1.	Allgemein	72
4.3.2.	Praktische Durchführung	72
4.4.	Proteinanalytik	73
4.4.1.	Lysat Präparation	73
4.4.2.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	77
4.4.3.	Westernblot	79
4.4.4.	Proteome Profiler Array	80
4.4.5.	Durchflusszytometrie	82
4.5.	MTT Zellviabilitätsassay	86
4.5.1.	Allgemein	86
4.5.2.	Praktische Durchführung	87
4.5.3.	Auswertung	90
4.6.	Transfektionsassays	91
4.6.1.	Allgemein	91
4.6.2.	Transfektion von MV3-Zellen	92
4.6.3.	Vermessung und Auswertung – TOPflash-Assay MV3	93
4.6.4.	Transfektion von MCF-7-Zellen	94
4.6.5.	Vermessung und Auswertung – TOPflash-Assay MCF-7	97
4.7.	Transduktion – Etablierung einer β1-Integrin <i>knock-down</i> Zelllinie	98
4.7.1.	Allgemein	98
4.7.2.	Puromycin <i>Killcurve</i>	99
4.7.3.	Transduktion von MCF-7- und MV3-Zellen	100
4.7.4.	Validierung des β 1-Integrin <i>knock-down</i>	101
5.	Ergebnisse und Diskussion	103
5.1.	Zugrunde liegende Untersuchungen	103
5.2.	Screening der MCF-7-Mammakarzinomzellen	104
5.2.1.	Einleitung	104
5.2.2.	Ergebnisse	105
5.2.3.	Schlussfolgerung	111

5.3.	Signalweg 1: Wnt-signaling	112
5.3.1.	Einleitung	112
5.3.2.	Ergebnisse	112
5.3.3.	Schlussfolgerungen	118
5.4.	Signalweg 2: FAK/PI3K/Akt-signaling	120
5.4.1.	Einleitung	120
5.4.2.	Ergebnisse	122
5.4.3.	Schlussfolgerungen	133
5.5.	Signalweg 3: MAPK-signaling	135
5.5.1.	Einleitung	135
5.5.2.	Ergebnisse	136
5.5.3.	Schlussfolgerungen	145
5.6.	Inhibitoren des MAPK-signaling	148
5.6.1.	Einleitung	148
5.6.2.	Ergebnisse	149
5.6.3.	Schlussfolgerungen	151
5.7.	Inhibitoren und Wnt-signaling in MV3-Melanom-zellen	155
5.7.1.	Einleitung	155
5.7.2.	Ergebnisse	155
5.7.3.	Schlussfolgerungen	163
5.8.	Ergänzende Untersuchungen an der MV3-kd-Zelllinie	170
5.8.1.	Einleitung	170
5.8.2.	Ergebnisse	171
5.8.3.	Schlussfolgerungen	172
5.9.	Vergleich und Auswirkungen der Befunde	173
6.	Zusammenfassung	177
7.	Anhang	179
7.1.	Literaturverzeichnis	179
7.2.	Abbildungsverzeichnis	205
7.3.	Tabellenverzeichnis	212
7.4.	Danksagung	213
7.5.	Publikationen und Posterbeiträge	214

Abkürzungsverzeichnis

Das folgende Abkürzungsverzeichnis enthält Angaben über alle verwendeten Abkürzungen mit Ausnahme von Angaben zu Produktbezeichnungen und Rechtsformen, sowie chemischen, mathematischen und physikalisch geläufigen Einheiten und Symbolen. Dazu gehören auch römische und griechische Zahlen und Ziffern. Lateinische und englische Begriffe werden in kursiv kenntlich gemacht.

% (V/V)	Volumenprozent
ABC	<i>ATP binding cassette</i>
ADMIDAS	Benachbarte Metallionen-abhängige Bindungsstelle
ADP	<i>Adenosindiphosphat</i>
Akt	Proteinkinase B
AML	Akute myeloische Leukämie
AMP	Adenosinmonophosphat
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
ARID2	<i>AT-rich interactive domain-containing protein 2</i>
ATM	<i>Ataxia-telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Axin1/2	<i>Axis inhibition protein 1/2</i>
BCA	<i>Bicinchinonic acid</i>
BCL9	<i>B-cell lymphoma 9 protein</i>
BCRP	<i>Breast cancer resistance protein</i>
BER	<i>Base excision repair</i>
RAF	<i>v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog</i>
BRCA1/2	Brustkrebsgen 1/2
BRG1	<i>Brahma-related gene-1</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
c-Abl	<i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
CAM-DR	<i>Cellular adhesion mediated drug resistance</i>
cAMPK	zyklische AMP-aktivierte Proteinkinase
CBP	<i>CREB-binding protein</i>
CD95	<i>Cluster of differentiation 95</i>

Abkürzungsverzeichnis

CDDP	Diammindichloridoplatin(II) /Cisplatin
CDK4/6	<i>Cyclin-dependent kinase 4/6</i>
CDKN2A	<i>Cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A</i>
Chk2	<i>Checkpoint kinase 2</i>
CK1 α	<i>Casein kinase 1α</i>
CMV	Cytomegalievirus
CREB	<i>cAMP-response element binding binding protein</i>
CRISPR/CAS9	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/ CRISPR-associated protein</i>
CTC	Zirkulierende Tumorzelle
CTLA4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4</i>
CTR	Kontrolle
CTR1	Kupfertransporter
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylinidol-dihydrochlorid
DDR1/2	Discoidin Domain-Rezeptoren 1/2
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Bufferd Saline</i>
DTC	Disseminierte Tumorzelle
DTT	Dithiothreitol
DVL	<i>Dishevelled</i>
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EMDR	<i>Environment-mediated drug resistance</i>
EMT	<i>Endothelial to mesenchymal transition</i>
ER	Östrogenrezeptor
ERK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
et al.	<i>Et alii</i>
FAK	Fokaleadhäsionskinase
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>

FGR	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FKS	Fötales Kälberserum Albumin
FL	Filter
FSC	Vorwärtsstreulicht
Fzd	<i>Frizzled-Rezeptor</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GnRH	<i>Gonadotropin releasing hormon</i>
GRB2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
GSK	<i>Glycogen synthase kinase</i>
HDAC	Histon-Deacetylasen
HER-2	Wachstumsfaktor Rezeptor 2
HNSCC	Plattenzellkarzinomen des Hals und Nackens
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HSP	<i>Heat shock protein</i>
Hygro	Hygromycin
I.E.	Internationale Einheit
IAC	Integrin-Adhäsions-Komplexe
IC50	<i>Half maximal inhibitory concentration</i>
IgG	Immunglobulin G
Il6	Interleukin 6
ILK	<i>Integrin-linked kinase</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
JAK	Januskinase
JNK	<i>Stress-activated protein kinase</i>
kd	<i>Knock-down</i>
KID	Kinase induzierbare Domäne
LEF	<i>Lymphoid enhancer factor</i>
LRP6	<i>Low-density lipoprotein receptor-related protein 6</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MDR1	p-Glykoprotein (<i>multi drug resistance</i>)

Abkürzungsverzeichnis

MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MET	<i>Mesenchymal to endothelial transition</i>
MIDAS	Metallionen-abhängige Bindungsstelle
MITF	<i>Microphthalmia transcription factor</i>
MKK	<i>Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MMPs	Metalloproteinasen
MOI	Multiplizität der Infektion
MRD	<i>Minimal residual disease</i>
mTOR	<i>Mechanistic target of rapamycin</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid
MX	Mithoxantron
NAD ⁺ /NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NF1	<i>Neurofibromatosis 1</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
p130CAS	<i>Breast cancer anti-estrogen resistance protein 1</i>
p38	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
p53	Tumorsuppressor p53
p16 ^{INK4a}	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
PAC	Puromycin-N-Acetyltransferase
PARP1	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1
PBS	<i>Phosphate Bufferd Saline</i>
PD1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
PDK1	3-Phosphoinositid-abhängigen Proteinkinase 1
PgR	Progesteronrezeptor
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PINCH	<i>Particular interesting new cysteine-histidine rich protein</i>
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PKA	<i>Proteinkinase A</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PORC	O-Acyltransferase Porcupine

PSI	Plexin-Semaphorin-Integrin-Domäne
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homolog</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAF	<i>Rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
RAS	<i>Rat sarcoma</i>
RF	<i>Resistance factor</i>
RFS	<i>Relapse free survival</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RTK	Rezeptortyrosinkinase
sc	<i>Scrambled control</i>
SD	Standardabweichung
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfate</i>
SERM	Selektiver Estrogenrezeptormodulator
SFK	Src-Familie
SFM-DR	<i>Solubale factor mediated drug resistance</i>
shRNA	<i>Small hairpin RNA</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SNAIL	<i>Zinc finger protein SNAI1</i>
SOS	<i>Son of sevenless</i>
Src	Akronym aus <i>cellular</i> und <i>sarcoma</i>
SSC	<i>Seitwärtsstreulicht</i>
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
Sy-MBS	Synergistische Metallionen Bindungsstelle
TAK1	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7</i>
TAZ	<i>PDZ-binding motif</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered saline with tween20</i>
TCF	<i>T-cell factor</i>
TGF β	<i>Transforming growth factor β</i>
TLE	<i>Transducin-like enhancer protein</i>
TNF	Tumornekrosefaktor

Abkürzungsverzeichnis

TRAF6	<i>TNF receptor-associated factor 6</i>
UAW	Unerwünschte Arzneimittelwirkung
UV	Ultraviolett
VEGF-A	Vaskuläre endothelialer Wachstumsfaktor-A
WHO	<i>World Health Organisation</i>
WNK1	<i>Lysine deficient protein kinase 1</i>
Wnt	<i>Wingless-related integration site</i>
WT	<i>Wildtype</i>
YAP	<i>Yes-associated protein</i>
β-TrCP	<i>F-box/WD repeat-containing protein 1A</i>

1. Einleitung

Krebserkrankungen stellen bis zum heutigen Tag die zweithäufigste Todesursache, direkt nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen in der westlichen Welt, dar. Neoplasien sind dabei so mannigfaltig wie komplex, und trotz großer Anstrengung und milliardenschweren Investitionen ist es bis heute nicht gelungen Krebs zu heilen. Hatte noch zu Beginn der 80er Jahre der amerikanische Präsident Richard Nixon zum „War on Cancer“ aufgerufen und in Aussicht gestellt, dass innerhalb von 25 Jahren diese Geißel der Menschheit besiegt sein würde (1), so befindet sich die Wissenschaft derzeit auf dem Standpunkt, dass Krebs in seiner Gesamtheit nicht zu heilen ist. Abhängig von Entstehung und Manifestation scheint es aber möglich die Erkrankung zu stabilisieren und sie in eine Form zu überführen, die einer chronischen Erkrankung gleicht. Ähnlich den aktuellen Erfolgen in der HIV-Therapie kann so ein Krankheitsbild entstehen, das über die gesamte Lebensspanne des Patienten persistiert ohne letale Folgen zu haben. Vereinfacht gesagt soll ein Leben mit dem Krebs ermöglicht werden.

Um sich diesem Ziel zu nähern werden die Leitlinien-gerechten Behandlungsschemata für die einzelnen Krebsarten immer spezifischer, was neben einer immer präziser werdenden Bestrahlung des entarteten Gewebes insbesondere die Pharmakotherapie immer komplexer und zielgerichteter werden lässt. Nichtsdestotrotz ist die Fünfjahres-Überlebensrate bei vielen Krebserkrankungen noch immer sehr gering (2). Dabei haben sich in einigen Krebsarten bereits prädikative Marker etablieren lassen, die eine gezielte Behandlung bestimmter Patientenkollektive ermöglichen und sich positiv auf das Gesamtüberleben der Patienten auswirken. Wurden Patienten früher mit einem auf empirischen Erkenntnissen basierenden Schema der zur Verfügung stehenden Zytostatika behandelt, ist es heute möglich die Effektivität der Behandlung vorab durch Detektion bestimmter Tumormarker zu evaluieren. Hier sind insbesondere Mutationen des BRAF-Gens, die Überexpression des humanen epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptors 2 (HER-2) oder das Vorhandensein von BRCA 1/2 Mutationen zu nennen. Ihr Vorhandensein wirkt sich bereits im Vorfeld Therapie-bestimmend aus (3).

Der dieser Arbeit zugrunde liegende Brustkrebs stellt in vielerlei Hinsicht ein Paradebeispiel dieser Entwicklung dar. Brustkrebs gehört neben dem Lungen- und

Darmkrebs in der Gesamtbevölkerung zu den drei häufigsten Krebserkrankungen, in der weiblichen Bevölkerung stellt er sogar die häufigste maligne Erkrankung dar (4). Einer Behandlung vorausgehend erfolgt zunächst die Klassifikation des Tumors anhand zellulärer und gewebspezifischer Eigenschaften (5). Die anschließenden Behandlungsoptionen orientieren sich stark an der vorrangegangenen Klassifizierung und berücksichtigen darüber hinaus das Alter des Patienten, eine bereits erfolgte Metastasierung, weitere patientenindividuelle Umstände sowie Komorbiditäten. Hat ein Patient bspw. einen HER-2 positiven Brustkrebs, so wird er zusätzlich zur klassischen Chemotherapie mit Trastuzumab sowie Pertuzumab behandelt (6). Die Kombination aus Screening, Chemotherapie, targetierter Therapie und einem chirurgischen Eingriff bietet hier die besten Erfolgsaussichten für den Patienten. Aktuelle Leitlinien, wie die S3 Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft und der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe ev. und wissenschaftliche Übersichtsarbeiten belegen dabei klar den Nutzen und die breite Anwendung klassischer Chemotherapeutika (7). Sie schaffen Leidensminderung, ergänzen targetierte Ansätze und bilden das Rückgrat der modernen Krebsmedizin (8). In anderen Tumorerkrankungen wie dem malignen Melanom stellten Dacarbazin, Cisplatin und weitere Zytostatika bis vor kurzem die einzige verfügbare Therapieoption dar.

Umso schwerwiegender war und ist das Auftreten von Resistenzen im Verlauf einer Chemotherapie. Insbesondere nach erfolgreicher Erstbehandlung beobachtet man trotz der immer besser werdenden Therapieoptionen häufig einen späteren Rückfall bereits therapierter Patienten. Die wieder auftretenden Tumore sprechen dann auf die initial sehr effektive Chemotherapie nicht oder nur noch bedingt an, der Tumor ist resistent geworden. Man spricht in diesem Zusammenhang auch oft von der *minimal residual disease*, also einem Verbleib cancerogener Zellen im Organismus während und nach der Behandlung, der zum Rückfall und einer Resistenzformierung führt. Das Verständnis für das Auftreten dieses Phänomens ist bis heute nicht ausreichend vorhanden.

An dieser Stelle soll die vorliegende Arbeit ansetzen, indem sie sich mit dem Konzept der *minimal residual disease* und dem ihr zugrunde liegenden Prozess der *cellular adhesion mediated drug resistance* (CAM-DR) auseinandersetzt. Ein Phänomen der Adaption, bei der Tumorzellen durch die Interaktion mit der sie umgebenden Extrazellulärmatrix eine schnelle Resistenzantwort gegen das verwendete Zytostatikum entwickeln. Dieser

Vorgang, ursprünglich an einer hämatopoetischen Zelllinie entdeckt, ist mittlerweile für eine Vielzahl an Tumorsubtypen beschrieben (9). Und obwohl man diesen Vorgang bereits seit der Jahrtausendwende kennt und die Erkenntnis, dass Tumorzellen über einen Zell-Zell Kontakt oder eine Zellbindung an die Extrazelluläre Matrix (ECM) eine Resistenz ausbilden können, bereits Ende der 90er publiziert wurde, gibt es bis heute noch große Lücken im Verständnis der zugrunde liegenden Prozesse.

Die Arbeit soll helfen, die Lücken zu schließen, und darüber hinaus Möglichkeiten aufzeigen den Prozess der CAM-DR zu beeinflussen und damit im Idealfall zu vermeiden bzw. eine erneute Sensitivierung herbeizuführen. Dafür wurden eine Melanomzelllinie und eine Mammakarzinomzelllinie verwendet, um die Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der intrazellulären Signalweiterleitung nach Bindung an eine simulierte ECM als Grundlage der CAM-DR herauszuarbeiten.

Sowohl die Mammakarzinom- als auch die Melanomzelllinie weisen auf ihrer Oberfläche Bindeproteine auf, die der Klasse der Integrine zugeordnet werden und die maßgeblich an der CAM-DR beteiligt sind. Durch die Stimulation und Modifizierung dieser Integrine ist es möglich die zentralen Signalwege der integrinvermittelten Signalweiterleitung und ihre Interaktion mit Signalwegen der Resistenz zu untersuchen und zu identifizieren. Dabei zeigt sich, dass in Melanomzellen der Wnt-Signalweg zu einer verstärkten Resistenzbildung beiträgt, während in den Brustkrebszellen sowohl der Integrin-Signalweg, als auch der MAPK-Signalweg eine entscheidende Rolle spielen. Zusätzlich wurde an ausgewählten Stellen auf den Unterschied in der Resistenzbildung zwischen Cisplatin (CDDP) und Mitoxantron (MX) eingegangen.

Als konzeptioneller Beweis wurde in einem weiteren Schritt eine *knock-down* Variante der $\beta 1$ Integrinuntereinheit in beiden Zelllinien erzeugt und die Veränderungen in den zuvor aufgeschlüsselten Signalwegen betrachtet. Dabei bestätigt sich für die Brustkrebszellen die Relevanz des MAPK-Signalwegs, während für die Wnt-Regulierung in den Melanomzellen ebenfalls eine $\beta 1$ -Abhängigkeit sichtbar wird. Untersuchungen mit teilweise bereits in der Klinik eingesetzten Inhibitoren verdeutlichen dabei die Relevanz der $\beta 1$ -Untereinheit in der Resistenzbildung der untersuchten Tumorentitäten. Darüber hinaus bieten die Ergebnisse Erkenntnisse für konzeptionelle Ansätze zur Sensitivierung, wie sie in der Diskussion der vorliegenden Arbeit besprochen werden.

2. Theorie

2.1. Grundlagen der untersuchten Krebserkrankungen

2.1.1. Mammakarzinom

2.1.1.1. Inzidenz und Klassifizierung

Brustkrebs (synonym auch Mammakarzinom) ist, wie in der Einleitung bereits angesprochen, eine der drei häufigsten Krebserkrankungen weltweit. Allein 2018 wurden rund 2 Millionen Neuerkrankungen diagnostiziert, und es ist eine Steigerung der Inzidenz um rund 60 % innerhalb der nächsten 20 Jahre zu erwarten (10). Findet eine geeignete Früherkennung statt, ist Brustkrebs eine potentiell heilbare Erkrankung. Dabei ist vor allem die chirurgische Entfernung des erkrankten Gewebes zur Standardtherapie geworden. Weitere Optionen stellen die Bestrahlung und der Einsatz systemischer Therapien dar. Um die bestmögliche Therapieoption zu ermitteln ist eine umfassende Bildgebung (Mammographie und Ultraschalluntersuchungen) erforderlich, die über eine Biopsie abgesichert wird. Dabei wird der Tumor klassifiziert in vier Hauptgruppen mit weiteren Untergruppen. Sie unterteilen sich in: luminal A, luminal B, HER2-positiv und basal-ähnlich (*triple*-negativ), wie in Abbildung 1 gezeigt (11).

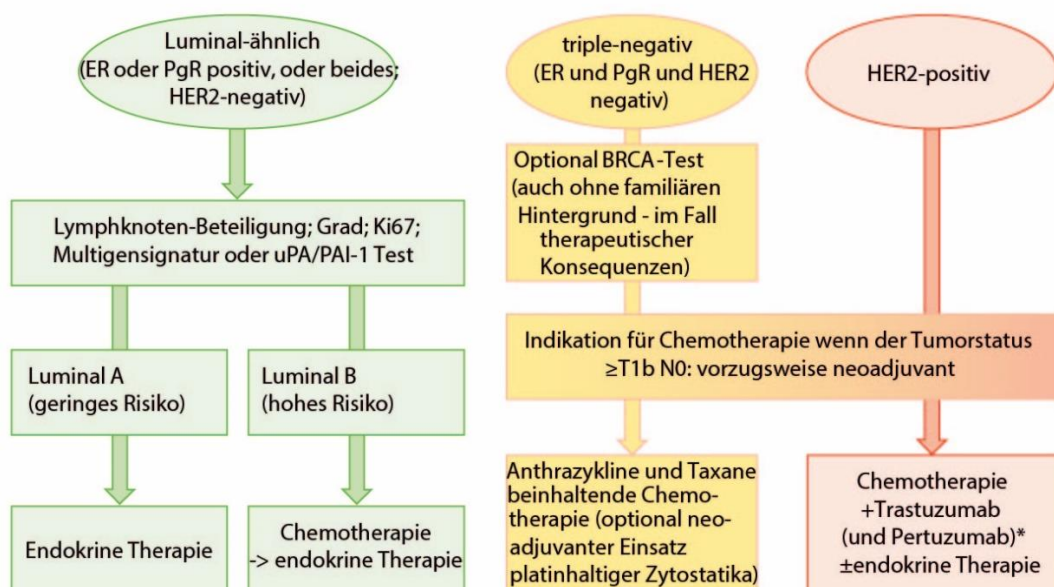


Abbildung 1: Klassifizierungs- und Therapieschema des Mammakarzinoms. Modifiziert nach Harbeck et al. (11).

Die weitere Klassifizierung erfolgt über den Steroidhormonrezeptorstatus und die Proliferationsrate. Ki-67 dient dabei als Marker zellulärer Proliferation. Da Ki-67 in der zellulären Ruhephase (G0-Phase) nicht exprimiert wird, ist der prozentuale Anteil von Ki-67 in den Wachstumsphasen der Zelle direkt proportional zur Proliferationsrate. Es klassifiziert den Tumor somit als hoch- oder niedrigriskant für aggressives Wachstum und Metastasierung (12). Abschließend kann auf Grundlage der Klassifizierung, der Lokalisation der Tumormasse und der Patientenwünsche ein Therapieplan erarbeitet werden. Bei früh erkanntem Brustkrebs ist die brusterhaltende Operation Mittel der ersten Wahl, und eine vollständige Entfernung des erkrankten Gewebes wird durch die „*no ink on tumor*“ Validierung abgesichert (13). Dabei wird das entfernte Gewebe in Tinte eingelegt und die Färbung der Gewebeabschnitte als Indikator verwendet. Bei ausbleibender Färbung des Tumors gilt der Eingriff als erfolgreich. Die Mastektomie bleibt somit auf extreme Fälle begrenzt (11). Eine neoadjuvante Chemo- und Endokrintherapie wird abhängig von der Tumorbiologie eingesetzt, um den Tumor im Vorfeld chirurgischer Maßnahmen zu verkleinern. In einigen Tumorsubtypen lässt sich somit der Einsatz chirurgischer Maßnahmen reduzieren (14). Zu den chirurgischen Maßnahmen gehört die Entfernung von Lymphknoten der Axilla nach Überprüfung des/der Wächterlymphknoten(s), um einer weiteren Streuung des Tumors vorzubeugen und evtl. bereits vorhandene Streuungen zu identifizieren (15). An die chirurgische Entfernung schließt sich oftmals eine Radiotherapie an. Ihr Einsatz dient der Eradikation verbleibender Tumorzellen an der Operationsseite des Primärtumors, oder sie wird genutzt zur gezielten Bestrahlung von infiltrierten axillären Lymphknoten. Dabei ist je nach Patient und Tumor zwischen den Nebenwirkungen einer Bestrahlung und dem individuellen Nutzen abzuwägen, was den Einsatz der Radiotherapie in Brustkrebspatienten bzgl. Anwendungsgebiet und Risiko zu einem kontrovers diskutierten Thema macht (16–18). Die systemische Therapie lässt sich in die endokrine Therapie und die Chemotherapie gliedern und ist abhängig von der Klassifikation des Primärtumors (7,11).

2.1.1.2. Behandlungen von Brustkrebs im Frühstadium

Brustkrebs im Frühstadium zeichnet sich dadurch aus, dass keine Ausbreitung außerhalb der Brust oder der axillären Lymphknoten stattgefunden hat (19). In allen luminalen, also

Hormonrezeptor-positiven Tumoren, gehört die endokrine Pharmakotherapie zum Behandlungsstandard. Dabei wird als Standardmedikament der selektive Estrogenrezeptormodulator (SERM) Tamoxifen eingesetzt. Prämenopausale Frauen werden über fünf Jahre mit einer täglichen Dosis von 20 mg Tamoxifen behandelt, was das Rezidivrisiko signifikant verringert (20). Ist das Rezidivrisiko besonders hoch (z.B. nach erfolgter Chemotherapie oder Überschreiten des 35. Lebensjahres) kann der Zusatz eines Gonadoliberein- (GnRH-) Analogons wie Buserelin indiziert sein, möglicherweise auch in Kombination mit einem Aromatasehemmer wie Letrozol. In postmenopausalen Frauen hingegen stellen Aromatasehemmer von Beginn an eine Alternative zu Tamoxifen dar. Studien zeigen sogar eine Überlegenheit der Aromatasetherapie gegenüber dem SERM (21). Der Einsatz sollte unter Abwägung der möglichen UAW der beiden pharmakologischen Optionen erfolgen. So kann es unter Tamoxifen zu einem erhöhten Risiko der Bildung eines Endometriumkarzinoms kommen, während Aromatasehemmer das Knochenfrakturrisiko steigern (21). Das Auftreten der UAW wird dabei umso wahrscheinlicher, je länger das Präparat eingesetzt wird, sodass von einer länger als fünf Jahre dauernden Therapie in der Regel abgesehen wird, obwohl sie potentiell das Rezidivrisiko weiter senkt (22).

Bei Brustkrebs im Frühstadium sollte möglichst schnell nach dem chirurgischen Eingriff mit der Chemotherapie begonnen werden. Sie besteht standardmäßig aus Anthracyclinen und Taxanen, die in Kombination oder sequentiell verabreicht werden (7). Darüber hinaus stehen weitere Zytostatika zur Verfügung, die als Ergänzung eingesetzt werden, darunter Cyclophosphamid und 5-Fluorouracil. Es hat sich gezeigt, dass eine *dose-dense* Strategie konventioneller Chemotherapie überlegen ist. Dabei werden die Zytostatika in kürzeren Zyklen verabreicht, ohne jedoch die Dosis zu steigern (23,24). Handelt es sich um ein *triple*-negatives Mammakarzinom, wird empfohlen, die neoadjuvante Chemotherapie mit einem platinhaltigen Zytostatikum zu kombinieren. Das Add-on von Carboplatin hat sich als vorteilhaft herausgestellt und es scheint eine Korrelation zwischen dem Auftreten von BRCA1/2 Mutationen und einem starken Therapieansprechen zu bestehen, was einen Einsatz in diesem Patientenkollektiv nahe legt (25,26).

Bei Vorliegen eines HER2-positiven Karzinoms wird die Chemotherapie mit Trastuzumab kombiniert und vorwiegend als Anthracyclin/Taxan- oder Docetaxel/Carboplatin- (TCH) Kombination verabreicht (14). Ein neoadjuvanter Einsatz

von Trastuzumab kann je nach Risikobewertung indiziert sein. Der neoadjuvante Ansatz hat sich dabei vor allem für Patienten mit positivem HER2 Status bei gleichzeitiger Abwesenheit hormonaler Rezeptoren etabliert (27). Eine weitere Option stellt die duale Blockade des HER2 mittels Tyrosinkinaseinhibitor in Kombination mit HER2-Antikörper dar (vertikale Blockade) oder die Doppel-Antikörper-Blockierung (horizontale Blockade) (28). Dieser Ansatz wird auch dann empfohlen, wenn der HER2 positive Tumor metastasiert hat (7,11,14). Ergänzend zu diesen Therapieregimen erhalten Patienten oftmals Bisphosphonate, um die UAW der eingesetzten endokrinen Therapie aufzufangen. Es gibt Hinweise darauf, dass diese Wirkstoffgruppe zusätzlich auch eine antimetastatische Wirkung besitzt (29).

2.1.1.3. Behandlung metastasierten Brustkrebses

Der größte Unterschied in der Therapie des metastasierten Brustkrebses im Vergleich zu Brustkrebs im Frühstadium ist die Tatsache, dass metastasierter Brustkrebs mit den derzeit zur Verfügung stehenden Methoden nicht heilbar ist (30). Eine Problematik liegt vor allem darin, dass Patienten mit metastasiertem Brustkrebs oftmals zuvor eine hochpotente Chemotherapie erhalten haben, und sich die verbleibenden Tumorzellen als resistent erweisen (31,32). Dementsprechend stehen für betreffende Patienten vor allem die Aufrechterhaltung der Lebensqualität und ein palliativer Ansatz im Vordergrund. Da chirurgische Maßnahmen und Radiotherapie nur lokal eingesetzt werden können, ist die Therapie vor allem auf den Einsatz systemischer Ansätze begrenzt (33). Für Hormonrezeptor-positive Tumore wird in erster Linie eine endokrine Therapie bis zum Versagen oder dem Auftreten schwerer Komplikationen angewendet, woraufhin sich eine Chemotherapie anschließt (34). In HER2 positiven Tumoren wird eine gezielte HER2 Therapie mit einer endokrinen Therapie kombiniert. Zusätzlich wird hier bereits früh mit einer Chemotherapie begonnen (vorwiegend Taxane) (14). In *triple*-negativen Tumoren ist eine Chemotherapie indiziert und oftmals hocheffektiv, da diese Unterform stark aggressiv proliferiert und metastasiert und somit Chemotherapien gegenüber äußerst empfindlich ist. Trotz des guten Ansprechens *triple*-negativer Tumore auf die Chemotherapie ist die Erkrankung assoziiert mit einer negativen Prognose, was auch als *triple negativ paradox* bezeichnet wird (35,36).

Erkenntnisse der letzten Jahre legen nahe, dass ein kombinierter Ansatz endokriner Optionen mit einer targetierten Therapie die Behandlung metastasierten Brustkrebses stark verbessert (11). Dabei werden gezielt Inhibitoren von Schlüsselmolekülen der zugrundeliegenden Signalwege eingesetzt. Darunter fallen bspw. Everolimus (mTOR-Inhibitor), Palbociclib (CDK4/6-Inhibitor) oder Buparlisib (PI3K-Inhibitor), die bereits in klinischen Studien erprobt wurden und werden (37–39). Ihre Effektivität hängt dabei stark vom Vorliegen genetischer Mutationen, mit Einfluss auf die targetierten Signalwege, ab. Dies macht ein individuelles Maßschneidern der Therapie erforderlich, da nicht jeder Patient von der Behandlung profitieren kann. Hinzu kommt die Bildung von Resistenzen gegenüber Therapien, die gezielt Signalkaskaden targetieren. Ein tiefergreifendes Verständnis der zugrunde liegenden Signalwege und möglicher Quervernetzungen im Resistenzgeschehen von Tumorzellen ist somit unabdingbar (36,40). Eine Problematik, die auch in der Therapie des malignen Melanoms eine wichtige Rolle spielt.

2.1.2. Melanom

2.1.2.1. Inzidenz, Entstehung und Klassifizierung

Das kutane Melanom ist eine der aggressivsten Krebserkrankungen im Menschen. 2018 erkrankten weltweit rund 280.000 neue Patienten an einem kutanen Melanom (10) und die fünf-Jahres-Überlebensrate liegt bei unter 20 % (10,41). Dabei hängt die steigende Inzidenz der Erkrankung stark mit der geographische Lokalisation und der Intensität der UV-Exposition der Menschen zusammen, was die verhältnismäßig hohen Inzidenzraten in Australien und Neuseeland zeigen (42). Hinzu kommt, dass hellere Hauttypen eher betroffen sind als Menschen mit dunklerer Haut. Weitere Risikofaktoren sind die wiederholte Aussetzung der Haut an UV-Licht, Sonnenbrand oder Solarien sowie das Vorhandensein genetischer Prädispositionen oder dysplastischer und melanozytärer Nävi (umgangssprachlich auch „Muttermale“ oder „Leberflecken“ genannt) (43,44).

Die Entwicklung eines Melanoms hängt dabei oftmals mit der Akkumulation genetischer Läsionen zusammen. Je mehr Läsionen Melanozyten über die Zeit akkumulieren, desto schneller proliferieren sie, was wiederum zur vermehrten Bildung von Läsionen führt.

Der Prozess verstärkt sich somit selber im Laufe der Zeit. Viele Mutationen innerhalb kutaner Melanome weisen charakteristische UV-Signatur-Mutationen auf, wie den Austausch eines Cytosins durch Thymidin (45). Auf Signalebene der Zelle entstehen dadurch Überaktivierungen, Deaktivierungen, Quervernetzungen und andere Veränderungen in sonst kontrolliert ablaufenden Signalnetzwerken. Häufige Mutationen, die dieses Prinzip verdeutlichen, finden sich in B-RAF, PTEN oder p53, d.h. in Signalwegen mit Einfluss auf Zellwachstum und Apoptose. Ihre Mutationen führen auf Proteinebene zu Alterationen essentieller Signalwege, wie dem MAPK-*signaling*, PI3K/Akt-*signaling* und dem mTOR-*signaling* (8). Dies führt zu unterschiedlichen pro-tumorigenen Veränderungen. Die Überaktivierung von MAPK-*signaling* konnte mit erhöhter Cyclin-D1-Expression und Inhibierung der Apoptose korreliert werden (46,47). PI3K/Akt aktiviert mTOR-*signaling*, was Proliferation, Angiogenese und verminderte Apoptose zur Folge haben kann (48). Ebenfalls betroffen sind Prozesse des JAK/STAT-*signaling*, die nach der Ausschüttung von Interferonen stimuliert werden und zur Expression des *programmed cell death protein 1*-(PD-1) Liganden in den betroffenen Zellen führt. Dieser Ligand bindet den PD1-Rezeptor auf T-Zellen und inhibiert somit eine Immunantwort gegenüber der Tumorzelle (49).

Kutane Melanome lassen sich über drei Merkmale klassifizieren: die Tumordicke (*T stage* vom englischen *thickness*), die Lymphknoteninvolvierung (*N stage* vom englischen *lymph node*) und das Auftreten von Metastasen (*M stage* vom englischen *metastasis*). Anhand dieser drei Kriterien wird dem Tumor anschließend eine Bewertung von eins bis vier zugewiesen, zu denen Unterkategorien wie z.B. 3B (T0/ N2b, N2c, N3b, oder N3c /M0) existieren (50). Zusätzlich erfolgt heutzutage eine genetische Klassifikation in vier häufig auftretende Mutationen. Dabei ist die am häufigsten auftretende Mutation, in rund 50 % aller Melanome, die abnormale Expression des *v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B* (B-RAF). Weitere 25 % der Mutationen entfallen auf *rat sarcoma* (RAS) Mutanten (N-RAS, K-RAS und H-RAS) und 15 % auf *neurofibromatosis 1* (NF1) mutierte Melanome. Die restlichen 10 % betreffen Wildtypmutationen. Neben diesen vier Hauptmutationen liegen oftmals weitere Mutationen vor, von denen die wichtigsten CDKN2A, PTEN, p53, und ARID2 sind (51,52).

2.1.2.2. Behandlung des malignen Melanoms

Ist der Tumor klassifiziert, schließt sich die Behandlung an. Dabei wird in einem ersten Schritt der Primärtumor und abhängig von der *T stage* weiteres umliegendes Gewebe chirurgisch entfernt. Zusätzlich ist in den meisten Fällen eine Biopsie des Wächterlymphknotens erforderlich (abhängig vom Alter des Patienten und der *T-stage*). Aufgrund des hohen Risikos eines Rezidivs ist für Patienten mit einem Tumor Klasse 2B oder höher eine adjuvante Therapie indiziert (53). Tumore der Klasse 2 können mittels Radiotherapie oder Interferon- α behandelt werden. Beim Vorliegen eines Tumors der Klasse 3 kommen Checkpoint-Inhibitoren und B-RAF/MEK-Inhibitoren zum Einsatz, die in der aktuellen S3-Leitlinie zur Behandlung des Melanoms neu für 2019 eingeführt wurden (50,53). Kürzlich abgeschlossene Studien belegen den Nutzen dieser Therapien, da sie signifikant das *relapse free survival* (RFS) steigern konnten und haben zur Zulassung von Ipilimumab (CTLA4 Antikörper), Nivolumab und Pembrolizumab (beides PD1-Inhibitoren) geführt (54–56). Zusätzlich hat die Kombination aus Dabrafenib (B-RAF Inhibitor) und Trametinib (MEK-Inhibitor) sowohl ein verbessertes RFS gezeigt, als auch eine Verbesserung des Gesamtüberlebens (57) verglichen mit Placebo. Die alleinige Therapie mit Vemurafenib (B-RAF Inhibitor) hingegen zeigte bisher keinen Zusatznutzen (58). Für Melanome, die entfernte Metastasen gebildet haben (Klasse 4), gilt grundsätzlich dasselbe Vorgehen. Zusätzlich kann zu einer Reduzierung der Tumorlast und Verlangsamung der Proliferation von Gehirnmetastasen eine Chemotherapie indiziert sein (59). Dabei kommt unter anderem Cisplatin (häufig in Kombination mit weiteren Zytostatika) als Standardtherapie zum Einsatz. Auch kann eine Elektrochemotherapie in Metastasen angewendet werden, bei der nach Elektroporation Cisplatin direkt in die Metastase appliziert wird. Neue Ansätze versuchen auch das Potential einer klassischen Chemotherapie auszunutzen, um bspw. die Interferon- α -Anwendung zu ergänzen und damit die Therapie weiter zu optimieren (50,60–62).

Im Folgenden sollen zwei Standardtherapeutika dieser klassischen Chemotherapien zur Behandlung von Brustkrebs (Mitoxantron und Cisplatin) und dem kutanen Melanom (Cisplatin) näher betrachtet werden.

2.1.3. Zytostatika

2.1.3.1. Mitoxantron

Entdeckung und Struktur

Mitoxantron (MX) stellt eine Weiterentwicklung der Anthracycline dar und zählt selber zur Gruppe der Anthracendione. Diese Zytostatika üben ihre Wirkung über die Interkalation der DNS, eine Induktion von Strangbrüchen und die Hemmung der Topoisomerase II aus. Eingeschränkt wird ihr Einsatz allerdings durch die erhebliche Kardiotoxizität der Verbindungen, da Kardiomyozyten auf eine spezielle Unterform der Topoisomerase II angewiesen sind, die bei einer systemischen Therapie ebenfalls gehemmt wird. Die kardiotoxische Wirkung ist dabei dosisabhängig und häufig irreversibel (63,64). Mitoxantron hingegen ist weniger kardiotoxisch als klassische Vertreter der Anthracycline wie beispielsweise Doxorubicin, und wird in zahlreichen Indikationen verwendet, darunter insbesondere das fortgeschrittene Mammakarzinom, hochmaligne Lymphome und hormonresistente Prostatakarzinome (65–67).

Die Entdeckung der Verbindungsklasse zytotoxischer Antibiotika vom Anthracyclin-Typ ist dabei auf zwei Befunde der 1950er Jahre zurückzuführen. Forscher der Farmitalia Labore isolierten ein Molekül aus *Streptomyces peucetius*, einem im Boden vorkommenden Bakterium, das ein Chromophor mit Anthracendion-Struktur enthielt, welche glykosidisch mit dem Aminozucker Daunosamin verknüpft ist. Ungefähr zur selben Zeit identifizierte eine französische Forschergruppe dasselbe Molekül und nannte es Rubidomycin, abgeleitet von seiner tiefroten Farbe. Die Fusion beider Namen führte zur Bezeichnung Daunorubicin, unter dem die Verbindung bis heute als Zytostatikum bekannt ist (68,69). Der nächste Schritt in der Entdeckung des Mitoxantron war die Entwicklung von Doxorubicin, welches aus einer mutierten Bakterienkultur von *Streptomyces peucetius* isoliert werden konnte (70). Basierend auf diesen Verbindungen schlossen die Forscher damals auf eine optimale Interkalation der DNS durch die Verwendung eines möglichst planaren polyaromatischen Ringsystems. Zusätzlich wurde das Aminoglykosid entfernt, da man ihm die kardiotoxische Wirkung zuschrieb, und durch verkürzte Alkylamino-Seitenketten substituiert (71). Verbindungen, die diesen Kriterien entsprechen, kannte man zu diesem Zeitpunkt bereits aus der Farbindustrie, wo sie als Färbemittel und Pigmente Verwendung fanden (72). Auch hier entdeckten zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander die Verbindung, heute bekannt als Mitoxantron,

und evaluierten diese folgerichtig als äußerst potentes Zytostatikum in Tumorzellsystemen (71,73). Abbildung 2 zeigt die chemische Struktur von Mitoxantron. Es handelt sich um eine Anthracendion-Grundstruktur, bestehend aus drei planaren polyaromatischen konjugierten Ringsystemen mit Diketon-Funktionalität an den Positionen 9 und 10. An Position 1 und 4 sind jeweils Hydroxygruppen lokalisiert, und an den Positionen 5 und 8 sind zwei 2-Hydroxyethylamino-Seitenketten über eine Ethylamino-Struktur mit dem Anthracendion verknüpft. Mitoxantron trägt deshalb den IUPAC Namen: 1,4-Dihydroxy-5,8-bis-[2-(2-hydroxyethylamino)-ethylamino]-anthracen-9,10-dion.

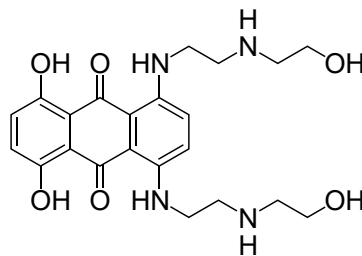


Abbildung 2: Chemische Struktur von Mitoxantron

Wirkungsmechanismus

Der Wirkungsmechanismus von Mitoxantron ist äußerst komplex und lässt sich derzeit auf vier verschiedene Prinzipien aufteilen, die sich aus der Struktur ableiten lassen und in zahlreichen Experimenten validiert wurden. Die primäre Wirkung von Mitoxantron besteht in der Inhibierung der Topoisomerase II als interkalierendes Enzymgift, und verhindert dabei die Wiederverknüpfung (im Folgenden *Religation* aus dem Englischen) der DNS durch die Topoisomerase II. Um diesen Vorgang zu verstehen, ist es wichtig den Ablauf der Topoisomerase II vermittelten DNS-Entwindung zu betrachten. Die Topoisomerase kann die DNS-Topologie verändern, indem sie unter ATP-Verbrauch gezielte Doppelstrangbrüche einführt und somit die Superspiralisierung der DNS aufhebt. Initiiert wird dieser Prozess durch die Bindung der Topoisomerase an den Abschnitt der DNS, der gespalten werden soll, man bezeichnet ihn auch als G-Segment. Es bildet sich ein Spaltungskomplex, indem die 5'Enden der Bruchstellen an einen Tyrosinrest innerhalb der katalytischen Domäne der Topoisomerase kovalent gebunden werden. Daraufhin kann der Doppelstrang (T-Segment) die Sollbruchstelle passieren und es folgt

die *Religation* der DNS. Dabei greifen die freien 3'OH-Gruppen des offenen Strangs nucleophil die Phosphotyrosin-Bindung an und stellen die ehemalige Phosphatester-Bindung wieder her (74,75). Der zyklische Prozess der DNS-Spaltung durch die Topoisomerase II und die Inhibition durch Mitoxantron sind in Abbildung 3 illustriert.

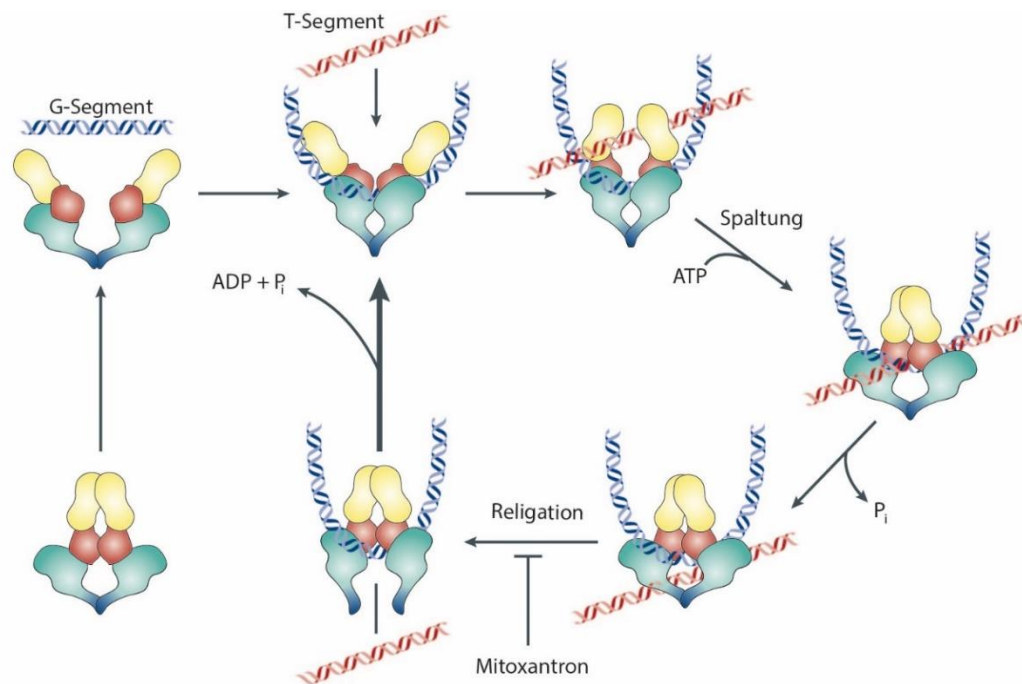


Abbildung 3: Zyklus der Topoisomerase II vermittelten DNS-Spaltung, T-Segment-Passage und der DNS-Religation unter ATP-Verbrauch. Modifiziert nach Nitiss (75).

Die Topoisomerase II führt gezielt Strangbrüche in DNS-Abschnitten mit spezifischen Basenabfolgen durch (76). Mitoxantron bindet an ein Thymin direkt vor dem 5'Strangbruch (-1) und an Guanin in +2 Position (77). Zusätzlich vermitteln die 1,4-Hydroxygruppen der Anthracendion-Struktur Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Mitoxantron und den Aminosäuren der Topoisomerase. Die Hydroxyalkylamino-Seitenketten des Mitoxantron wickeln sich um die Nukleobasen gegenüber der Spaltungsstellen und wechselwirken ihrerseits mit den Aminosäureresten der Topoisomerase (78). Durch die Ausbildung dieses stabilen Komplexes ist es nicht mehr möglich eine *Religation* der DNS durchzuführen, und es entstehen permanente Doppelstrangbrüche. Nicht nur die Hemmung der Topoisomerase II, sondern auch die Bildung von Doppelstrangbrüchen ist für die Zytotoxizität von Mitoxantron verantwortlich (79). Neben diesem Hauptmechanismus werden die Bildung reaktiver

Oxidationsprodukte durch Enzyme (80,81), die Bildung von Formaldehyd-vermittelten DNS-Addukten (82) und die Kondensation von Nukleinsäuren innerhalb des Nukleus (83) diskutiert (84).

Pharmakokinetik

Die Aufnahme von Mitoxantron in die Zelle basiert auf passiver Diffusion und der Bildung von Lipidanlagerungen, die Mitoxantron über eine Flip-Flop-Kinetik in das Zytoplasma übertreten lassen (85,86). Dort angekommen verteilt sich Mitoxantron sowohl an den lipophilen Strukturen des Zytoskeletts, als auch im Nukleus und weiteren Zellkompartimenten und reichert sich dort an (87). Um diesem Prozess entgegenzuwirken exprimieren viele Mitoxantron-resistente Zellen verschiedene ATP-verbrauchende Effluxpumpen der ABC-Transporterfamilie (*ATP binding cassette*), insbesondere das P-Glykoprotein (auch MDR1). Als weitere Effluxtransporter wurden BCRP in Brustkrebszellen und MRP1 für die Mitoxantronresistenz beschrieben (88–90). Weitere Möglichkeiten der Resistenzentwicklung bestehen auch in Veränderungen der Zielstruktur (z.B. der Topoisomerase II) sowie Veränderungen der Mitoxantron-induzierten Signalwege, aber auch passive Mechanismen, die unabhängig vom verwendeten Zytostatikum ablaufen (siehe auch *post-target*-Resistenzen im Abschnitt Cisplatin).

Resistenzen

Mitoxantron-induziertes *signaling* kann als Antwort auf die verursachten DNS-Schäden angesehen werden und führt unter normalen Bedingungen zur Einleitung der Apoptose. Mutationen und Veränderungen dieser Apoptosemechanismen stellen somit eine Grundlage der Resistenzentwicklung von Melanomzellen dar. Dabei sind vor allem zwei Prozesse essentiell für die Wirkung von Mitoxantron: die Aktivierung des Tumorsuppressors p53 und die Signalweiterleitung über PI3K/Akt. Als erste Antwort auf die gebildeten Strangbrüche wird innerhalb der ersten zwei Stunden das Histon H2AX phosphoryliert. Dies geschieht unabhängig vom Zellzyklus, aber vorwiegend in G1 und S Phase (91). Zusätzlich wird zum selben Zeitpunkt *ataxia-telangiectasia mutated* (ATM) phosphoryliert, was seinerseits Chk2 (Thr 68) und p53 (Ser 15) aktiviert (92). Die Aktivierung von p53 führte in Studien zur Expression von CD95 (auch Fas genannt) und

zu CD95-vermittelter Apoptose (93,94). Im Kontrast dazu konnte aber auch gezeigt werden, dass p53 defizitäre Zellen unter einer Kombination aus Mitoxantron und einem Tyrosinkinaseinhibitor stark sensitiviert wurden, was auf die Vermittlung p53-unabhängiger Effekte des Mitoxantron hindeutet (95). Mutationen von p53 sind weit verbreitet in Krebszellen, genauso wie Mutationen von PTEN, dessen Untersuchungen die Bedeutung von PI3/Akt-*signaling* hervorheben. Dabei wurde vorwiegend die PTEN-Aktivität in Prostatakarzinomen untersucht, da Mutationen von PTEN hier besonders häufig auftreten. Durch die Abwesenheit von PTEN kommt es zu einer Überaktivierung der Akt, was die Resistenz gegenüber Mitoxantron in NCI H460-Zellen auf das bis zu 20fache steigern konnte (96). Die Akt-Aktivierung scheint in zahlreiche Prozesse der Apoptose-Maschinerie einzugreifen, die unter anderem über die *Fas-associated Death Domain* mit dem CD95-Rezeptor vernetzt sind und somit eine Interaktion zwischen p53 und PI3k/Akt in der Resistenzbildung gegen Mitoxantron nahelegt. Untersuchungen mit PI3K-Inhibitoren in Prostatakarzinomzellen bestätigten diesen Zusammenhang (97).

2.1.3.2. Cisplatin

Entdeckung und Struktur

Cisplatin gehört zur Gruppe der platinhaltigen Zytostatika und wurde erstmals Anfang der 80er Jahre erfolgreich in der Behandlung von Patienten mit Hodenkrebs eingesetzt (98). Vorrausgegangen war diesem Erfolg ein Zufallsbefund durch Rosenberg et al., die feststellten, dass bestimmte Elektrolyseprodukte platinhaltiger Elektroden die Zellteilung von *E. coli* Bakterien inhibierten (99). Anschließend identifizierten sie u.a. die Struktur (SP-4-2)-Diammindichloridoplatin(II) (CDDP), besser bekannt als Cisplatin, als höchst effektives Zytostatikum (100) und bereits 1978 erlangte Cisplatin als erster Vertreter platinhaltiger Zytostatika die Zulassung durch die amerikanische *food and drug administration* (FDA) (101).

Vom chemischen Standpunkt aus betrachtet handelt es sich bei Cisplatin um einen planaren Diammin-Komplex, dessen gleiche Liganden (Ammoniak und Chlorid) *cis*-ständig zueinander ausgerichtet sind. Die Chloridionen sind dabei weniger stark an das Platinion gebunden und fungieren als Abgangsgruppe, woraufhin der dann resultierend positiv geladene Platinkomplex elektrophil mit der DNS in Wechselwirkung treten kann (102). Nach außen ladungsmäßig neutral weist Cisplatin nur begrenzte

Löslichkeit in Wasser auf. Nichtsdestotrotz bilden sich in der Abwesenheit von Chloridionen innerhalb wässriger Lösungen, inklusive des zellulären Zytoplasmas, reaktive Aquakomplexe, die als bioaktive Form des Cisplatins betrachtet werden können. Es bilden sich als Hydrolyseprodukte Monoaqua-, Diaqua-, Monohydroxido-, Aquahydroxido- und Dihydroxido-Komplexe (103).

Ausgehend von diesen Erkenntnissen wird zur Stabilisierung cisplatinhaltiger Lösungen für die Chemotherapie die Zubereitung in einer NaCl-Lösung hergestellt. Dabei gewährleistet die Chlorid-Konzentration die Intaktheit des Arzneistoffes mit einem 97%igen Gehalt in der Infusionslösung. Innerhalb von Lösungen, die physiologischen Bedingungen wie dem Blut entsprechen ($\text{pH } 7,4$; $[\text{Cl}^-] = 0,11 \text{ mol/L}$), liegt der stabile Anteil bei rund 85 %. Bei intrazellulären Bedingungen von $\text{pH } 7,1$ und einer um Faktor 10 niedrigeren Konzentration an Chlorid-Ionen als im Blut, spaltet sich Cisplatin größtenteils in seine Hydrolyseprodukte auf (104).

Pharmakokinetik und Wirkungsmechanismus

Nach der Gabe von Cisplatin erreicht nur ein relativ geringer Anteil der verabreichten Dosis den Zielort, da neun von zehn Cisplatinmolekülen bereits an Proteine des Blutplasmas binden (102). Dort angekommen gelangt Cisplatin hauptsächlich mittels passiver Diffusion in das Zellinnere. Zusätzlich konnte auch eine Beteiligung von Kupfertransportern (CTR1) nachgewiesen werden (105,106). Innerhalb der Zelle bilden die hochreaktiven Aquakomplexe DNS-Addukte aus, indem sie die DNS innerhalb desselben Stranges (intrastrang) und zwischen zwei Strängen (interstrang) derselben Doppelhelix vernetzen (siehe auch Abbildung 4). Zusätzlich bilden sich Protein-DNS-Addukte (107,108).

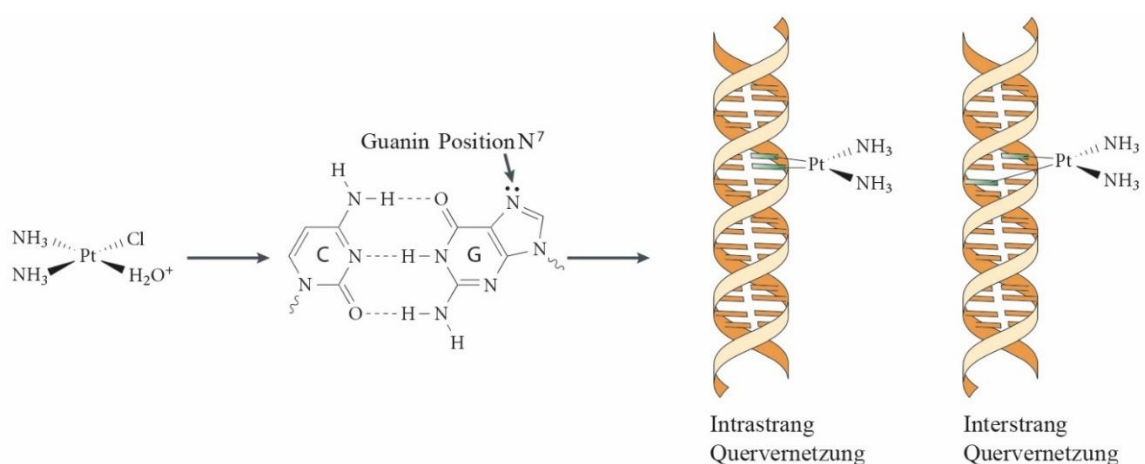


Abbildung 4: Bildung von Cisplatin DNS-Addukten. Modifiziert nach Kelland (108).

Die hochreaktiven Aquakomplexe binden dabei nucleophil an die Purinbasen der DNS. Vorzugsweise bindet Cisplatin in Position N7 des Guanin sowie an Cytosin in Position N3 und Adenin an Position N1 (101,109). Die Bildung dieser Addukte führt zum Zelltod durch Nekrose oder Apoptose, wenn die Schäden nicht durch Reparaturenzyme beseitigt werden können. (110). Die Einleitung der Apoptose findet über den Tumorsuppressor p53 statt, indem er den Zellzyklus arretiert und es der Zelle ermöglicht, DNS-Schäden zu reparieren oder in die Apoptose überzugehen. Daneben sind weitere Vorgänge beschrieben, die zur Apoptose beitragen, wie die Translokation von c-Abl (eine Tyrosinkinase) in den Nukleus (101,106,110). An dieser Stelle sei auch auf die therapierelevanten und dosislimitierenden unerwünschten Arzneimittelwirkungen (UAW) des Cisplatins hingewiesen. Dominant sind dabei eine Nephrotoxizität sowie den Gastrointestinaltrakt betreffende Toxizitäten zu nennen, die auf die hohe und unspezifische elektrophile Reaktivität des Cisplatin zurückzuführen sind. Weiterentwicklungen von Cisplatin, wie das Carboplatin oder Oxaliplatin, zeigen bei gleichem Wirkmechanismus eine besser steuerbare, wenn auch geringere Wirkpotenz, was auch zu einer Reduzierung nephrotoxischer Eigenschaften führt. Je nach Behandlungsbild stehen somit unterschiedliche platinbasierte Therapeutika zur Verfügung (108,111,112).

Resistenzen (pre-target, post-target, on-target, off-target)

Die Zelle reagiert neben der Apoptose als Ergebnis einer Cisplatinwirkung auch mit Mechanismen zu dessen Entgiftung, die sich in vier Unterformen gliedern lassen. Diese

bilden das Grundgerüst der zellulären Resistenz, da sich alle Resistenzmechanismen einer Unterform zuordnen lassen. Man unterscheidet dabei zwischen *pre-target*-, *post-target*-, *on-target*- und *off-target*-Mechanismen/Resistenzen. Unter einer *pre-target*-Resistenz versteht man Mechanismen, die dazu führen, dass Cisplatin nicht in Kontakt mit seiner Zielstruktur (DNS) treten kann. Dazu zählt die verringerte Zellaufnahme von Cisplatin, erhöhte Sequestrierung und ein gesteigerter Cisplatin-Efflux. Eine wichtige Rolle spielen u.a. die verminderte Expression von CTR1, die erhöhte Expression von Kupfer-transportierenden ATPasen und die Bildung von Glutathion-Konjugaten (106,108,113,114). Bei der *post-target*-Resistenz hingegen variiert die Zelle ihr intrazelluläres *signaling* in einem komplexen Zusammenspiel verschiedener Signalwege, die auf unterschiedliche Art und Weise anti-apoptotisch, aber auch pro-metastatisch oder pro-tumorigen wirken können. Darunter befinden sich Signalwege, wie das PI3K/Akt-*signaling*, das MAPK-*signaling*, und Signalwege der Apoptose wie bspw. Caspasen-vermitteltes *signaling*. Diese Aufführung ist nicht abschließend und eine ausführliche Besprechung aller Signalwege ist im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Jedoch werden im weiteren Verlauf des Theorieteils und in den Untersuchungen dieser Arbeit von den hier genannten Signalwegen das PI3K/Akt-*signaling* und das MAPK-*signaling* ausführlicher betrachtet (101,106).

Des Weiteren kann die DNS als Zielstruktur für Cisplatin zu der Resistenzbildung beitragen, was als *on-target*-Resistenz bezeichnet wird. Die hier auftretenden Veränderungen umfassen die Reparatur entstandener DNS-Schäden, eine Toleranzentwicklung gegenüber den verursachten DNS-Läsionen oder eine fehlerhafte Detektion der DNS-Veränderungen. Stellvertretend sei hier die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1 (PARP1) genannt, die eine wichtige Rolle beim *base excision repair* (BER) spielt, indem sie Unterbrechungen in der DNS erkennt und mit weiteren an der Reparatur beteiligten Molekülen interagiert, wie den Topoisomerasen I und II oder dem p53 (106,115). Eine Überexpression dieser Enzyme führt somit zu einer *on-target*-Resistenz. Dem gegenüber steht der Begriff der *off-target*-Resistenz. Wie bei der *post-target*-Resistenz handelt es sich hierbei oftmals um eine Beeinflussung des intrazellulären *signalings* zur Initiation von Prozessen, die das Zellüberleben sichern. Im Unterschied zur *post-target*-Resistenz werden hier jedoch Veränderungen des *signalings* durch Moleküle verursacht, die in keinem direkten Zusammenhang zur Cisplatin-

Behandlung stehen (106). Eine entscheidende Rolle spielen dabei Adhäsionsmoleküle und membranständige Rezeptoren vom Typ der Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK), die den Austausch der Zelle mit ihrer Umwelt über Botenstoffe, die extrazelluläre Matrix (ECM) und umliegende Zellen vermitteln (116–118). Angestoßen werden auch hier die Signalwege des PI3K/Akt-*signaling* (FAK/PI3K/Akt-*signaling*) und MAPK-*signaling*, aber auch weitere Signalwege, wie das Wnt-*signaling*, das ebenfalls zu einem späteren Zeitpunkt in dieser Arbeit ausführlich besprochen wird. Die integrinvermittelte Resistenzbildung über die ECM, welche sich auch unter dem Begriff der *cellular adhesion mediated drug resistance* (CAM-DR) einordnen lässt, gehört ebenfalls zu den *post-target*-Resistenzen und wird in dieser Arbeit im Kontext der *minimal residual disease* (MRD) untersucht.

2.2. Resistenzbildung im Kontext der Metastasierung

2.2.1. Konzept der *minimal residual disease*

Das Auftreten von Rezidiven in bereits erfolgreich behandelten Patienten stellt eine große therapeutische Herausforderung dar und ist oftmals nur noch mit lebensverlängernden Therapieoptionen verbunden. Man spricht in diesem Zusammenhang häufig von der MRD. Diese umfasst per Definition vom Tumor abgetrennte und im Blutkreislauf oder dem lymphatischen System zirkulierende Zellen (CTCs), sowie disseminierte Tumorzellen (DTCs), also Tumorzellen, die sich in einer entfernten Nische dem Zugriff der Chemotherapie entziehen können (119,120). Diese CTCs und DTCs können ein hohes metastatisches Potential besitzen und somit einen Jahre späteren Rückfall bedingen, wie Abbildung 5 zeigt.

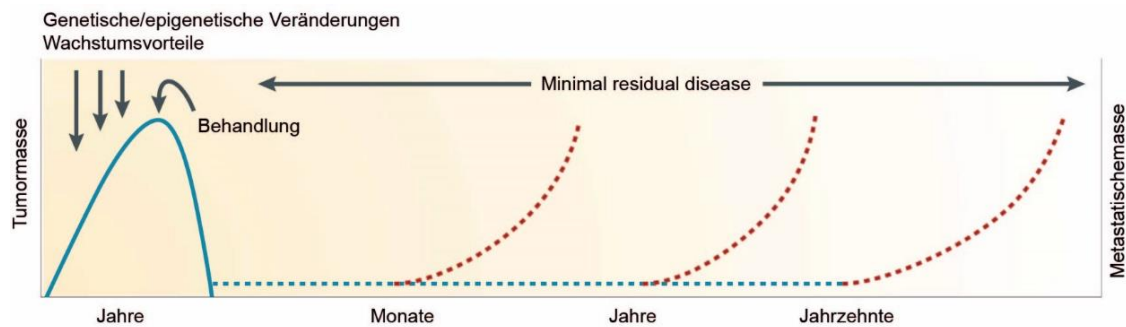


Abbildung 5: Schematischer Verlauf der *minimal residual disease* (MRD). Modifiziert nach Aguirre-Ghiso JA (121).

Es sei an dieser Stelle noch angemerkt, dass eine DTC sich aus einer CTC entwickelt, während sich eine CTC nicht zwangsläufig zu einer DTC differenzieren muss, sondern auch eine direkte Mikrometastase bilden kann (122). Man bezeichnet diesen Vorgang auch als „Seed and Soil“-Hypothese (123). Vereinfacht gesagt geht man davon aus, dass Tumorzellen wie Samen in den Kreislauf des Patienten abgegeben werden, die dann an anderer Stelle auf fruchtbaren Boden treffen und dort wieder anwachsen. Im Laufe der Jahre hat sich diese Hypothese immer weiter entwickelt, ihre Kernaussage gilt aber immer noch als korrekt (124). Hoshino et al. bspw. konnten zeigen, dass die Abgabe von Exosomen durch Zellen des Primärtumors und die Integrin gesteuerte, gewebsspezifische Aufnahme dieser Vesikel im Zielgewebe zur Ausbildung der metastatischen Nische beiträgt (125). Diese Erkenntnis bestätigt und erweitert die „Seed and Soil“-Hypothese.

Der Prozess der Metastasierung kann dabei über fünf grundlegende Schritte erklärt werden. In einem ersten Schritt bildet der Tumor ein Netzwerk an ihn versorgenden Blutgefäßen aus; man spricht von Angiogenese bzw. dem angiogenen Schalter. Ausgelöst wird dieser Prozess durch ein Ungleichgewicht an pro-angiogenen Wachstumsfaktoren, wie dem Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGR) und dem vaskulär endothelialen Wachstumsfaktor-A (VEGF-A) (126). Im zweiten Schritt der Intravasation gelangt eine Subpopulation an Tumorzellen, die über eine endotheliale zu mesenchymalen Phenotypisierung (EMT) pro-metastatische und pro-migrative Eigenschaften ausbildet, über die neuen Gefäße in den Blutkreislauf (127,128). Nach der Intravasation bezeichnet man diese Zellen als CTCs. Studien haben gezeigt, dass täglich mehrere Millionen Zellen eines Primärtumors in Blutkreislauf und Lymphe des Patienten übergehen (129). Allerdings überlebt nur eine geringe Anzahl dieser Zellen und eine Ausbildung von Metastasen tritt nur in einem verschwindend geringen Prozentsatz auf (124). Auch wenn

die Metastasierung bis heute für geschätzt rund 90 % der Todesfälle unter allen Krebserkrankungen verantwortlich ist (130), ist sie als evolutionäres Prinzip höchst ineffektiv (124,131).

Die CTCs, die nicht apoptotisch werden, können an einer anderen Stelle im Körper wieder aus dem Gefäß austreten und somit den dritten Schritt der Metastasierung, die Extravasation, durchlaufen. In ihrem Zielgebiet der metastatischen Nische bilden die Zellen entweder eine Mikrometastase aus oder sie persistieren dort als DTCs (122). DTCs begeben sich dabei oft in einen Ruhezustand (G0-G1 Arrest), in dem sie keine Zellteilung mehr vollziehen und somit für viele Zytostatika keine Zielstruktur mehr aufweisen. Jahre später können diese Zellen durch verschiedene Stimuli wieder aus ihrem Ruhezustand erwachen und ein erneutes Ausbrechen der Erkrankung bedingen (132). Bis heute ist es nicht möglich vorherzusagen, wann die Zellen ihren Ruhezustand wieder verlassen (121). Die Lokalisation der disseminierten Zellen hingegen ist oft vorhersagbar. Viele solide Tumore streuen vor allem in das Knochenmark, wo sie günstige Bedingungen vorfinden aufgrund einer hohen Dichte an Wachstumsfaktoren und einer ausgeprägten Ausformung an ECM-Strukturen (133,134). Sowohl CTCs, die eine Mikrometastase ausbilden, als auch DTCs, die ihren Ruhezustand verlassen, durchlaufen abschließend die Umkehr ihrer Phenotypisierung von mesenchymal zu endothelial (MET) (127). Abbildung 6 zeigt den Prozess der Metastasierung vom Primärtumor zur Mikrometastase.

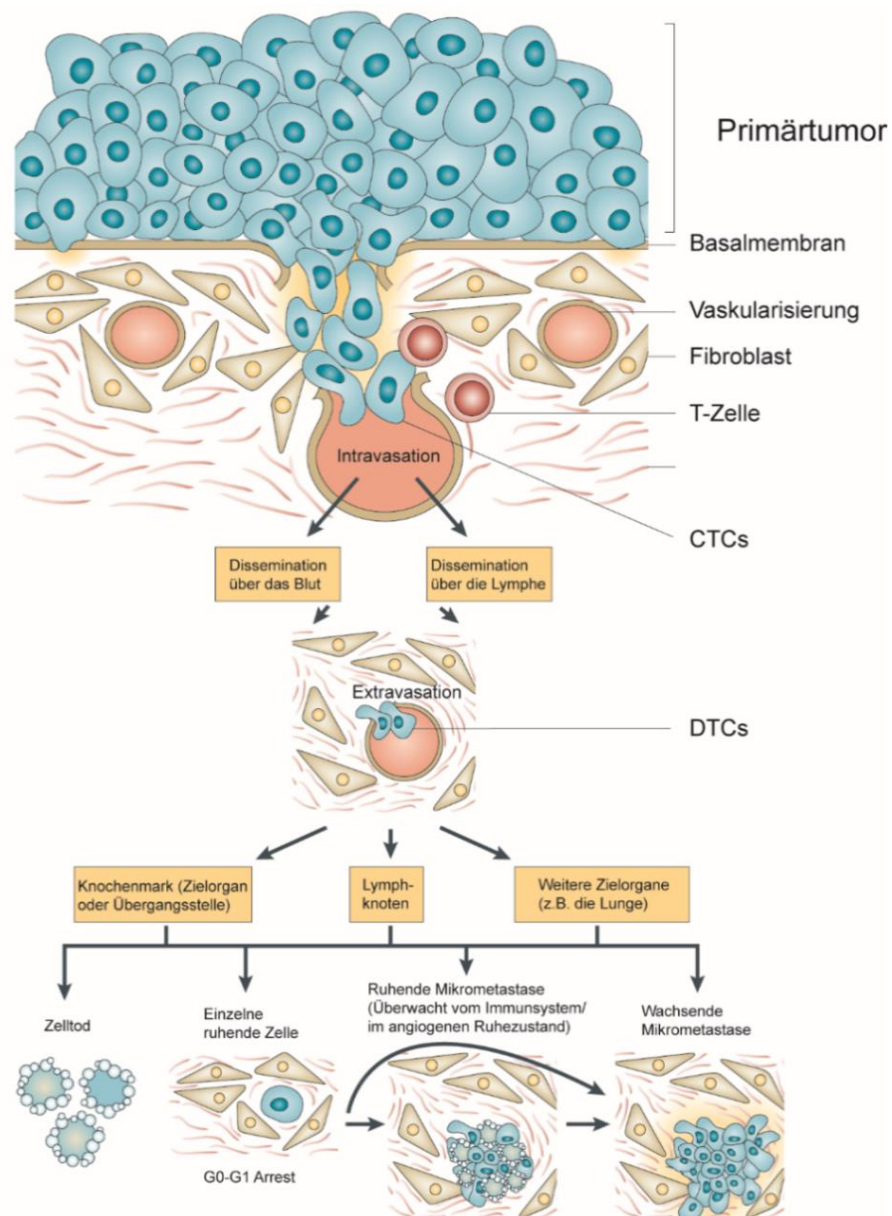


Abbildung 6: Prozess der Metastasierung. Modifiziert nach Aguirre-Ghiso JA (1991).

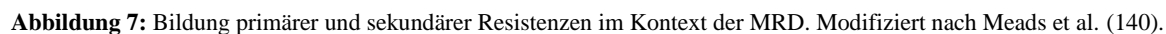
Aktuelle Forschungsergebnisse legen sogar nahe, dass die Metastasierung nicht nur ein im späten Verlauf der Tumorerkrankung auftretender Prozess ist, sondern dass es bereits in Frühphasen des Primärtumors zu einer Ausbildung von Metastasen kommen kann (135). Auch weisen in als geheilt geltenden Brustkrebspatienten auftretende Metastasen ein weniger stark modifiziertes Genom auf als der zuvor entfernte Primärtumor (ohne lokale Invasionen in einem sehr frühen Stadium entfernt) (136). Dies ist eine insofern interessante Erkenntnis, da in der gängigen Theorie davon ausgegangen wird, dass Zellen innerhalb des Primärtumors selektiert werden, sodass sich Zellen mit den genetisch am

besten adaptierten Veränderungen durchsetzen und dann spätere Metastasen ausbilden. Dies kann auch weiterhin nicht ausgeschlossen werden, es ist aber zu vermuten, dass CTCs, DTCs und die Bildung von Mikrometastasen bereits viel früher im Krebsgeschehen eine Rolle spielen als bisher angenommen. Die Induktion des Ruhezustandes kann durch stressinduziertes *signaling*, Autophagie, Einflüsse der Mikroumgebung, angiogenes *signaling* und durch das Immunsystem vermittelt werden (137). Diese Prozesse sind dabei nicht als unabhängig und singulär ablaufend zu betrachten, sondern bilden ein komplexes Netzwerk in der Entstehung Chemotherapie-resistenter Zellen und sind auch dazu in der Lage, andere Resistenzmechanismen in Mikrometastasen und soliden Tumoren auszulösen.

2.2.2. Resistenzbildung

Für diese Arbeit spielen vorrangig das durch Zytostatika forcierte stressinduzierte *signaling* und die über die Mikroumgebung vermittelten Signalprozesse eine Rolle. Diese Resistenzen lassen sich auch als *de novo*- oder Primärresistenzen klassifizieren, da sie nicht auf eine längerfristige Akkumulation genetischer Veränderungen basieren (Sekundärresistenzen), sondern eine rasche Zelladaption darstellen (138,139). Zusätzlich unterscheidet man zwischen einer intrinsischen und einer extrinsischen *de novo*-Resistenz. Die intrinsische Resistenz basiert auf zufälligen, bereits vorhandenen, genetischen Mutationen, die durch den selektiven Druck einer Zytostatikatherapie zum dominanten Überlebensmerkmal avancieren. Die extrinsische Resistenz hingegen basiert auf äußeren Einflüssen, die die Tumorzelle vor schädlichen Einflüssen schützt. Somit ist dieser Prozess maßgeblich für die Entwicklung der MRD, da sie Zellen auch schützen, wenn keine genetische Adaption vorliegt (140).

Die Resistenzausbildung durch Interaktion mit der Mikroumgebung (extrinsische Resistenz) wird auch unter dem Begriff *environment-mediated drug resistance* (EMDR) zusammengefasst und weiter unterteilt in zwei grundlegende Prozesse. Dabei wird die über lösliche Faktoren vermittelte Zytostatikaresistenz (SFM-DR) von der über die zelluläre Adhäsion vermittelte Zytostatikaresistenz (CAM-DR) unterschieden (140,141). Erstere bezeichnet alle Resistenzbildungen, an denen Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren beteiligt sind, während Letztere durch integrinvermittelte Adhäsion an Komponenten der Extrazellulärmatrix (ECM) ausgelöst wird (142,143). Häufige



25

die Fähigkeit der Signalweiterleitung und die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen von entscheidender Bedeutung sind, in Bezug auf die Resistenzbildung im Kontakt mit der ECM (149,150).

Beispielsweise konnte im Mausmodell bestätigt werden, dass die Expression des $\alpha 4 \beta 1$ -Integrins für die Entwicklung der MRD in an AML-erkrankten Patienten entscheidend ist. AML-Patienten mit einer hohen Expression an $\alpha 4 \beta 1$ hatten ein erhöhtes Rückfallrisiko und geringere Überlebenschancen (151). In sekundären AML-Tumoren waren erhöhte $\alpha 4$ -Expressionslevel vorhanden, verglichen mit neu diagnostizierten Tumoren (152). Diese *in vivo*-Befunde ließen sich mit zahlreichen *ex vivo*-Daten bestätigen, und das nicht nur in hämatopoetischen, sondern auch in soliden Tumoren. Die CAM-DR schützt somit nicht nur CTCs und DTCs als Begründer der MRD, sondern ermöglicht es auch bereits etablierten Zellen sekundäre Resistenzen auszubilden. Bereits 2006 untersuchten Hazlehurst et al., wie unter dem Schutz einer CAM-DR die Ausbildung einer Mitoxantron-Resistenz in U937-Zellen um den Faktor zwei bis drei stärker zunimmt als in den Kontrollzellen. Dafür kultivierten sie U937-Zellen auf Fibronektin, verglichen mit einer Suspensionskontrolle und ließen beide Ansätze durch wochenlang wiederholte Exposition mit Mitoxantron eine Mitoxantron-Resistenz entwickeln. Eine anschließende Mikroarray-Analyse beider Ansätze wies unterschiedliche Gen-Expressionsmuster auf (ca. 400 Veränderungen in beiden Ansätzen mit nur etwa 70 Übereinstimmungen). Dieses Experiment verdeutlicht, dass die CAM-DR zusätzlich zu ihrer primären Schutzfunktion auch mitprägend für die Entwicklung von Sekundärresistenzen ist (153).

2.3. Integrine

2.3.1. Struktur

Die Integrine bilden eine Gruppe transmembraner Rezeptoren, die für die Kontaktausbildung der Zelle zu ihrer Umgebung verantwortlich sind. Sie binden an Liganden der Zelloberfläche, an Komponenten der ECM aber auch an einige lösliche Faktoren. Strukturell handelt es sich um heterodimere Glykoproteine, die aus nicht-kovalent verbundenen α - und β -Untereinheiten aufgebaut sind (154). Sowohl α - als auch β -Untereinheit bestehen aus 750 bis 1000 Aminosäuren, die mehrere Domänen ausbilden. Diese sind durch flexible Linkerproteine miteinander verbunden und bilden eine große extrazelluläre Helix und einen relativ kurzen zytoplasmatischen Anhang. Die

α -Untereinheit besteht aus vier bis fünf Domänen, die sich in einen siebenblättrigen (*bladed*) β -Propeller, eine Schenkel- (*thigh*) und zwei Waden- (*calf*) Regionen einteilen lassen. Als fünfte Domäne besitzen neun der 18 bekannten α -Untereinheiten eine $\alpha 1$ Domäne, die zwischen dem zweiten und dritten Blatt des β -Propellers lokalisiert ist (155). Die Blätter vier bis sieben enthalten die Calciumbindungsstelle, welche sich im Zusammenspiel mit der $\beta 1$ -Domäne der β -Untereinheit bildet. Die $\alpha 7$ -Helix reguliert darüber hinaus die Zugänglichkeit der I-Domäne (α -Untereinheit), welche wie die I-ähnliche Domäne (β Untereinheit) eine Metallionen-Bindungsstelle aufweist (156). Man unterscheidet dabei drei verschiedene Regionen, deren Bindung von Calcium, Magnesium oder Mangan zu unterschiedlichen Konformationsänderungen führt und somit die Affinität gegenüber Integrinliganden mitsteuert. Man unterteilt sie in die „Metallionen-abhängige Bindungsstelle“ (MIDAS), die „benachbarte Bindungsstelle“ (ADMIDAS) und die „synergistische Metallionen Bindungsstelle“ (SyMBS) (157). Dabei ist vor allem hervorzuheben, dass der Bindung von Calcium eine inhibitorische Wirkung auf die Integrinaktivität ausübt (158), während Mangan als Agonist betrachtet wird (159), über den auch gemutmaß wird, dass er das Clustern der Integrine beeinflusst (160). Als Clustern wird in Bezug auf Integrine gesprochen, wenn sich mehrere Heterodimere innerhalb der Zellmembran zusammenlagern, um einen Punkt verstärkter Adhäsion zu bilden (161). Diese Integrin-Adhäsions-Komplexe (IACs) ermöglichen der Zelle über ihre Bindung hinaus eine Information über ihre Umgebung zu erlangen. Daraus resultiert eine Weiterleitung des mechanischen Einflusses, bspw. durch Veränderungen der ausgeübten Zugkraft am IAC, als zelluläres *signaling* (162).

Die extrazelluläre Domäne der β -Untereinheit setzt sich aus sieben Domänen zusammen, die über flexible Linker miteinander verbunden sind. Von außen nach innen folgt auf die $\beta 1$ -Domäne eine sie umschließende Hybriddomäne, die ihrerseits über die Plexin-Semaphorin-Integrin-Domäne (PSI) eingeschlossen ist. Den Abschluss bilden vier cysteinreiche Abschnitte, deren Sequenz auch innerhalb des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) enthalten sind, weshalb sie auch als „EGF ähnliche Domäne“ bezeichnet werden (163). Der Aufbau und die räumliche Anordnung beider Untereinheiten sind in Abbildung 8 detailliert dargestellt.

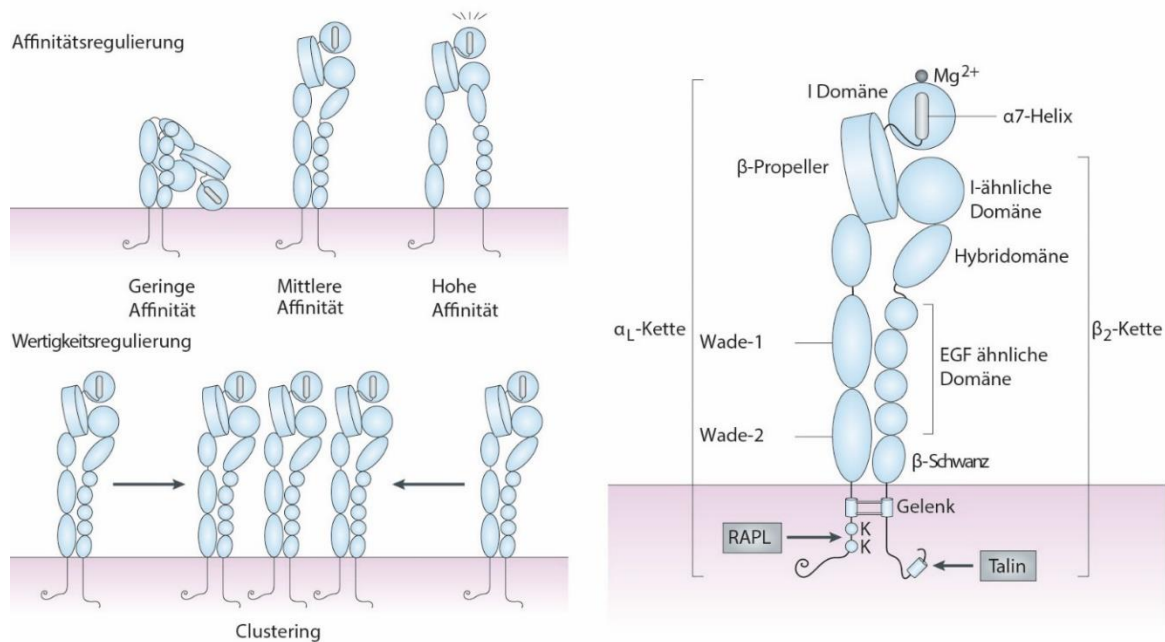


Abbildung 8: Struktureller Aufbau der Integrine und Regulierung der Bindungsaffinität und Wertigkeit (Clustern) von Integrinen. Modifiziert nach Kinashi (164).

Betrachtet man nun die Ligandenbindungsstelle der Integrine, welche sich an der Schnittstelle zwischen dem β -Propeller und der I-ähnlichen Domäne befindet, stellt man fest, dass die Integrine unterschiedliche Konformationen annehmen können, wodurch sich die Position der Bindungsstelle relativ zur Zelloberfläche ändern kann (165). Mit Aufklärung der Kristallstruktur der extrazellulären Domäne in $\alpha v \beta 3$ -Integrinen konnte bestätigt werden, dass die Ligandenbindungsstelle in einer gebeugten Konformation nahe der Zelloberfläche liegt (166). Weitere Untersuchungen erweitern dieses Konzept neben der gebeugten um weitere mögliche Konformationen, bis hin zur vollständigen Aufrichtung des Integrins (167). Diese vollständige Aufrichtung wird auch als *high-affinity state* bezeichnet (157) und der Übergang zwischen den einzelnen Konformationen als *switchblade*-Hypothese (163). Bedingt werden affinitätsverändernde Konformationsübergänge dabei oft über das *inside-out signaling*. Die erhöhte Affinität aufgerichteter Integrine resultiert aus einer räumlichen Trennung der membrannahen Abschnitte der Untereinheiten und einer verbesserten Zugänglichkeit der Ligandenbindungsstelle (164). Abbildung 8 zeigt den Übergang und die Positionierung des Integrins innerhalb der einzelnen Affinitätszustände.

2.3.2. Organisation der Integrin Superfamilie

Bis heute sind 18 α - und acht β -Untereinheiten in höheren Wirbeltieren identifiziert worden, die sich in vier Untergruppen gliedern lassen, wie in Abbildung 9 gezeigt. Man unterteilt sie dabei anhand der Zusammensetzung der Heterodimere und dem Substrat, an das sie binden. Folgende Untergruppen haben sich somit ergeben: Laminin-, RGD-, Kollagen- und die Leukozyten-spezifischen Rezeptoren (165,168).

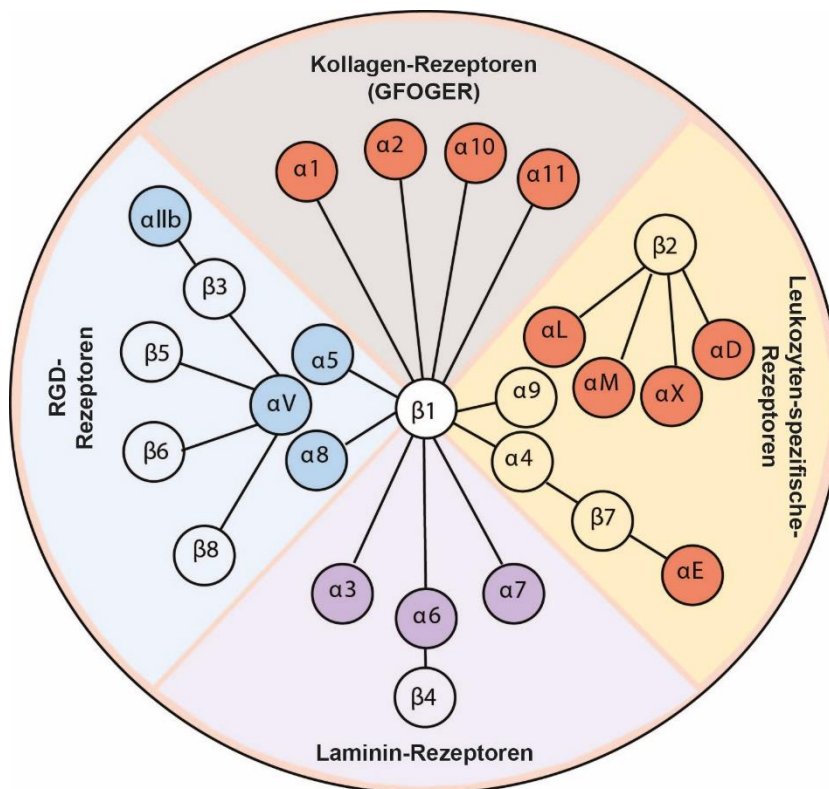


Abbildung 9: Übersicht der Integrin Familie. Modifiziert nach Barczyk et al. (168).

Die Laminin-Rezeptoren bilden drei heterodimere Kombinationen unter Beteiligung der $\beta 1$ -Untereinheit ($\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$) sowie eine Kombination mit der $\beta 4$ -Untereinheit ($\alpha 6\beta 4$). Deren genaue Bindungssequenzen und Funktionen variieren stark aufgrund der hohen Diversifikation der α -Untereinheiten, die aus den unterschiedlichen Splice-Varianten ihrer mRNA resultieren (169). Die Leukozyten-spezifischen Rezeptoren hingegen bilden sich, wie in Abbildung 9 gezeigt, hauptsächlich aus der $\beta 1$ - und $\beta 2$ -Untereinheit. Diese Unterfamilie von Integrinen übernimmt eine zentrale Rolle in der Leukozytenadhäsionskaskade. Dieser Prozess dient der Initiation der Einwanderung von Leukozyten in entzündetes Gewebe aus dem Blutstrom. Über P-,

E- und L-Selektine wird als erster Schritt das sogenannte Leukozyten-Rollen initiiert (170). Durch eine Interaktion der Selektine mit ihren Liganden verlangsamt sich das Rollen der Leukozyten am Gefäßendothel und eine vermehrte Interaktion der Integrine mit den Endothelzellen wird ermöglicht. Die Zelle adhärert, spreitet sich auf und transmigriert abschließend in das entzündete Gewebe (171). Dieser Prozess ist therapeutisch relevant bei chronisch entzündlichen Immunerkrankungen. So ist beispielsweise eine Inhibition des $\alpha 4 \beta 7$ -Integrins durch den monoklonalen Antikörper Vedolizumab mittlerweile in der Therapie der Colitis Ulcerosa und dem Morbus Crohn zugelassen worden (172–174). Die dritte Unterfamilie bilden die Integrine, die an das in der ECM häufig vorkommende Aminosäuren-Motiv Arg-Gly-Asp (RGD) binden (175). Diese wurde erstmals in Fibronektin identifiziert, dann aber auch in anderen ECM Substraten wie Vitronektin (176) und Laminin (177) gefunden. Mittlerweile ist bekannt, dass neben der Erkennung des RGD-Motivs auch die räumliche Anordnung und die Konformation dieser Sequenz von entscheidender Bedeutung für die Erkennung durch Integrine ist (178). Diese Untergruppe von Integrinen wurde in einer Vielzahl von Krebserkrankungen als prognostisches Werkzeug identifiziert. Eine vermehrte Expression kann Hinweise geben auf eine verstärkte Metastasierung, erhöhte Invasivität, einen aggressiven Krankheitsverlauf oder eine insgesamt negative Prognose (179,180).

Die letzte der vier Untergruppen bilden die kollagenbindenden Integrine. Sie binden an die sogenannte GFOGER-Sequenz, welche als kleinste gemeinsame Übereinstimmung für die Bindung an Kollagen Typ I und IV erforderlich ist. Darüber hinaus enthalten alle an GFOGER bindenden Integrine eine $\beta 1$ -Untereinheit (181). Daneben existieren weitere Erkennungssequenzen in anderen Kollagen-Typen wie Kollagen-IX und Kollagen-XVII, was erklärt, wieso auch Integrine der Laminin-Unterfamilie Kollagen binden können, wie $\alpha 5 \beta 1$ und $\alpha V \beta 1$ (182).

2.3.3. Die Extrazellulärmatrix

Die ECM besteht aus einem komplexen dreidimensionalen Netzwerk verschiedener Makromoleküle, die neben einer biomechanischen Funktion auch eine biochemische Rolle einnehmen. Die Zusammensetzung der ECM variiert dabei gewebe- und funktionsabhängig und kann durch eingebettete Tumore in ihrer Beschaffenheit

modifiziert werden (183). Brustkrebszellen bspw. zeigen eine schlechte Prognose, wenn Faktoren zur ECM Modifizierung verstärkt exprimiert werden (184).

Darüber hinaus sind viele Tumorzellen dazu in der Lage ihre eigene ECM zu exprimieren, was zur Folge hat, dass diese Zellen ein erhöhtes metastatisches Potential zeigen (185). Veränderungen der ECM in entarteten Geweben äußern sich auch über eine erhöhte Steifheit, die auf einer quervernetzten Kollagenstruktur beruht und es den Zellen ermöglicht, stärker zu proliferieren (183). Weitere durch die ECM beeinflusste Prozesse beinhalten die Vermeidung von wachstumssupprimierenden Faktoren, erhöhter Widerstand gegenüber apoptotischen Prozessen sowie eine Forcierung der Metastasierung (186). Als eines der wichtigsten Substrate soll hier Kollagen vorgestellt werden, das über die Integrine *signaling*-Prozesse innerhalb der Zelle anstößt (*outside-in signaling*).

Kollagene sind die am häufigsten vorkommenden Proteine in Säugetieren und werden in 28 verschiedene Mitglieder unterteilt. Als wichtigste strukturelle Übereinstimmung weisen alle Mitglieder eine dreifach helikale Struktur auf, die bis zu 96 % der gesamten Struktur einnehmen kann. Diese Struktur bildet sich aus drei Polypeptidketten, den sogenannten α -Ketten. Die α -Ketten unterscheiden sich je nach Kollagen-Typ in ihrem Aufbau an Aminosäuren (Anzahl und Abfolge) und können sowohl als Homotrimer, als auch als Heterotrimer vorliegen (187). Die Aminosäureabfolge innerhalb der α -Ketten folgt dem stringenten Muster Gly-X-Y, in dem X und Y häufig Prolin und 4-Hydroxyproline darstellen. Dazu kommen Asparagin und Lysin. Durch die große Anzahl an kleinen Glycin-Molekülen ist eine dichte Packung der Tripelhelix realisierbar, während Prolin eine enge Aufwindung der Peptidkette ermöglicht, da die relativ starre Struktur der zweifach gebunden Seitenkette keine flexiblen Kettenanpassungen (wie bspw. bei Glycin) zulässt. 4-Hydroxyprolin stabilisiert die Helix durch eine Wasserstoffbrücken-Bindungsausbildung nicht nur innerhalb der Helix, sondern auch mit den sie umgebenden Wassermolekülen (188). Lysin und Asparagin sorgen zusätzlich für elektrostatische Wechselwirkungen (189). Durch Unterbrechungen dieser Abfolge oder Veränderungen in der Aminosäuresequenz ist es möglich, der Struktur Flexibilität und Plastizität zu verleihen (190). Diese tripelhelikalen Strukturen können je nach Kollagen-Subtyp von anderen Regionen unterbrochen werden, was diese Proteine zu einem Multidomänen-Protein macht. Die weiteren Domänen können dabei anderen Proteinen, wie dem Fibronektin-Typ-III ähneln, und bedingen nicht nur eine strukturelle Änderung,

sondern beeinflussen auch die biologische Aktivität des Kollagens (191). Die verschiedenen Primärstrukturen des Kollagens führen zu unterschiedlichen supramolekularen Zusammenlagerungen. Man unterscheidet zwischen Fibrillen, aufgefüdelten Filamenten, verankerten Fibrillen und Netzwerken. Die für die Bindung von Integrin- β 1 wichtigen Kollagene I und IV gehören zu den Fibrillen-bildenden (I) (192) und den Netzwerk-bildenden (IV) Kollagenen (193). Die Bindung an Integrine erfolgt, wie oben bereits besprochen, über die GFOGER-Sequenz, es sind aber auch weitere mögliche Bindungsstellen bekannt (194). Nach erfolgter Bindung können Kollagene über eine Aktivierung intrazellulärer Signalwege Resistenzen vermitteln. Beispielhaft sind hier HER2-positive Brustkrebszellen erwähnt, die zusätzlich eine PIK3CA- (Gen, das für eine Untereinheit der PI3K kodiert) Mutation aufweisen, und eine Resistenz gegenüber klassischen HER2-Therapien sowie PI3K Inhibitoren zeigen. Die Bildung dieser Resistenzen ist dabei auf eine verstärkte genetische Expression von ECM-Substanzen und Adhäsionsrezeptoren zurückzuführen, was eindrucksvoll zeigt, dass Tumorzellen nicht nur das sie umgebende Kollagen als Überlebensstrategie verwenden, sondern dieses auch aktiv selber produzieren. Darüber hinaus konnten diese Resistenzen durch β 1-Blockade und Inhibierung der Kollagen-Synthese partiell nivelliert werden (195).

Eine weitere Rezeptorgruppe und Bindungspartner des Kollagens sind die *Discoidin Domain*-Rezeptoren 1 und 2 (DDR1 und DDR2). Diese Rezeptor-Tyrosinkinasen agieren unabhängig von den Integrinen (196) und binden vorwiegend an Kollagen Typ I, III and IV. Sie spielen eine Rolle in der Adhäsion, Migration, Proliferation und ECM-Umgestaltung und sind in den letzten Jahren als potentielle Zielstruktur in Krebserkrankungen immer relevanter geworden (197). Interessanterweise konnte für den DDR2-Rezeptor in Brustkrebszellen ein Zusammenhang zwischen der Kollagen-I-Aktivierung des Rezeptors und einer ablaufenden ERK-Aktivierung nachgewiesen werden (198). Diese Zusammenhänge werden in der späteren Diskussion der Arbeit wieder aufgegriffen.

2.3.4. Therapeutische Relevanz der Integrine

Die Abbildung 9 illustriert die Zusammensetzung der Integrine und wie die β 1-Untereinheit an der Bildung von 12 der 24 Integrine beteiligt ist, was sie zu einer

attraktiven therapeutischen Zielstruktur avanciert hat. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass $\beta 1$ -Integrine von entscheidender Bedeutung sind in der Resistenzbildung sowohl gegenüber Bestrahlungstherapie als auch Chemotherapie in Brustkrebs, Lungenkrebs u.a. (199–201). Um dieses Phänomen zu verstehen ist es wichtig sich zu verdeutlichen, dass Integrine nicht nur mechanische Funktionen übernehmen, sondern auch dazu in der Lage sind *signaling*-Prozesse zu vermitteln. Man unterscheidet dabei zwei Formen von Signalweiterleitung: das Weiterleiten von Signalen aus dem Zellinneren nach außen (*inside-out-signaling*) und der umgekehrte Prozess, die Weiterleitung externer Stimuli in das Zellinnere (*outside-in-signaling*). Das *inside-out-signaling* dient dabei vorrangig der Induzierung der aktiven Integrin-Konformation über Proteine wie der ILK (*integrin-linked kinase*), Talin, u.a. (202). Für die Resistenzbildung jedoch von größerem Interesse ist das *outside-in-signaling*, bei dem verschiedene Signalwege angestoßen werden, die sich wiederum gegenseitig beeinflussen können (*crosstalk*) (203). Die einzelnen Signalwege werden zu einem späteren Zeitpunkt ausführlich besprochen und hier nur im Kontext ihrer integrinabhängigen Aktivierung als therapeutisches Ziel erwähnt.

Aufgrund der großen Vielfalt an Kombinationsmöglichkeiten der $\beta 1$ -Untereinheit mit α -Untereinheiten und der damit verbundenen Abweichungen in der Substraterkennung überrascht es nicht, dass verschiedene Signalwege über das $\beta 1$ -Integrin angesteuert werden. Dabei gibt es Hinweise, dass eine Blockierung des $\beta 1$ -Integrin effektiver ist als die Blockierung einzelner α -Untereinheiten (204). Studien in Plattenzellkarzinomen des Hals und Nackens (HNSCC) zeigen eine Deregulierung der fokalen Adhäsionskinase (FAK) (205), während Brustkrebszellen zusätzlich über die Phosphoinositid-3-Kinase/Proteinkinase B (PI3K/Akt) nach Aktivierung des $\beta 1$ -Integrins reguliert werden können (200,206). In Myelomzellen, die eine Anthracyclin-Resistenz aufweisen, wurde eine Interleukin-6-(IL6)-Abhängigkeit gefunden (207). Hinzu kommt, dass Rezeptor-Tyrosinkinasen in Wechselwirkung mit Integrinen stehen und hier insbesondere der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) eine tragende Rolle zu spielen scheint. Er selbst steuert sowohl PI3K/Akt-*signaling* als auch das *mitogen activated protein kinase* (MAPK) *signaling* an (208). Sowohl in HNSCC als auch in nicht-kleinzelligem Lungenkrebs hat sich auf der Basis dieser Erkenntnisse eine Kombination der $\beta 1$ - und EGFR-Inhibierung als vielversprechender Ansatz gezeigt (201,209). Eine Untersuchung

dieses Phänomens in weiteren Tumorentitäten liegt nahe und bildet eine der Grundüberlegungen dieser Arbeit.

2.3.4.1. Integrinabhängiges *signaling* – ILK und FAK

Betrachtet man nun das dem Integrin unmittelbar nachgeschaltete *signaling*, so fallen als Schlüsselmoleküle zwei Kinasen auf, die jeweils eigene Signalprozesse anstoßen: zum einen die Fokale Adhäsionskinase (FAK) und zum anderen die ILK.

Die ILK ist eine Serin/Threonin-Kinase, die direkt mit dem zytoplasmatischen Ende der $\beta 1$ -Untereinheit verbunden ist (210). Sie besteht aus 452 Aminosäuren und besitzt drei funktionale Domänen mit unterschiedlichen Funktionen, wie der Bindung an das *particular interesting new cysteine-histidine rich protein* (PINCH) (211) und der folgenden Verbindung der Integrinuntereinheiten mit dem Zytoskelett über Actin (212–214), sowie der indirekten Bindung an den EGFR. Die ILK übernimmt hier eine strukturelle Funktion, indem sie an der Ausbildung von fokalen Adhäsionskomplexen beteiligt ist. Zusätzlich weist die dritte Domäne eine hohe Homologie zu den Domänen anderer Ser/Thr-Kinasen auf, mit nur geringfügigen Abweichungen innerhalb der katalytischen Schleife (215). Zahlreiche Studien haben versucht zu zeigen, über welche Regionen eine Kinaseaktivität vermittelt wird und ob der ILK überhaupt eine richtige Kinasefunktion zugesprochen werden kann. Dabei wurden als Ziele der ILK die Proteinkinase-B (Akt) und die Glykogensynthasekinase-3 (Gsk3- β) ausgemacht, deren Phosphorylierung an Thr 308 und Ser 473 (Akt) sowie Ser 9 (Gsk3- β) als *readout* verwendet wurden (216). Eine *in-vitro*-Kinaseaktivität scheint dabei gesichert (217), es ist aber noch nicht verstanden, ob eine zusätzliche Pseudokinaseaktivität vorliegt, bei der bspw. durch die Delokalisation eines Substrates anstelle einer direkten Phosphorylierung die Aktivierung erfolgt. Dieses Unterfangen wird nicht zuletzt dadurch erschwert, dass die ILK scheinbar je nach zellulärem Subtyp eine unterschiedliche Rolle einnehmen kann (212,215,217).

2.3.4.2. FAK/PI3K/Akt-*signaling*

Die Phosphorylierung der Akt kann allerdings auch über die ubiquitär exprimierte Tyrosinkinase FAK unter Mithilfe der PI3K initiiert werden. Diese Signalachse

bezeichnet man auch als FAK/PI3K/Akt-*signaling*. Ausgelöst wird sie durch Änderungen der Integrin-Konformation, die zur Autophosphorylierung der FAK an Tyr 397 (inter- oder intramolekular) und einer anschließenden Rekrutierung von Kinasen der Src-Familie, sowie der Phosphorylierung und Assoziation mit p130Cas und Paxillin führt (218). Auch der in dieser Arbeit verwendete Inhibitor „FAK Inhibitor 14“ wirkt über die Tyr 397-Bindungsstelle (219). Um diese Vorgänge verstehen zu können, ist es wichtig den Aufbau der FAK zu betrachten.

FAK besteht aus einer N-terminalen FERM-Sequenz, gefolgt von einer zentralen Kinaseregion, einer prolinreichen Domäne und der C-terminalen fokalen Adhäsions-Zieldomäne. Die FERM steuert die Interaktion mit Rezeptor-Tyrosinkinasen, wie dem EGRF, und reguliert die Autophosphorylierung der FAK (220). Die prolinreiche Domäne kann als Bindungsstelle für die Kinasen der Src-Familie (SFK) dienen und der C-terminale Anteil verbindet die FAK indirekt über Paxillin und Talin mit den Integrinen in fokalen Adhäsionen (221). Kommt es zu einem Clustern der Integrine durch Ausformung von Kontakten zur ECM, erfolgt eine Dimerisierung der FAK mit anschließender Autophosphorylierung an Tyr 397 (222), Src-Rekrutierung und dadurch bedingter Src-vermittelter Phosphorylierung der Aminosäuren Tyr 576/577 in der katalytischen Schleife. Es bildet sich der aktive Src-FAK-Komplex. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass auch eine Phosphorylierung an Tyr 925 der FAK durch Src möglich ist und dass dadurch eine Aktivierung von adhäsionsunabhängigem *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) *signaling* initiiert werden kann (223). Aktivierung des MAPK-*signaling* durch die FAK erfolgt über den *growth-factor-receptor-bound-2* (GRB2) und *son-of-sevenless* (SOS)-Komplex, wie in Abbildung 10 in lila gezeigt. Integrin $\alpha 5 \beta 1$, $\alpha 1 \beta 1$ und $\alpha V \beta 3$ stellen hier einen Spezialfall dar, da sie über die palmitoylierten SFKs (rot) Fyn und Yes sowie das Adapterprotein SHC (hellblau) den MAPK-Signalweg aktivieren können (224). Alternativ erfolgt auch eine MAPK-Aktivierung über die FAK/SFK-vermittelte Phosphorylierung von p130CAS (grün), die zusätzlich auch NF- κ B (braun) und JUN (blau) aktivieren kann (224).

Nach der Aktivierung an Tyr 397 kann die phosphorylierte FAK (pFAK) an die p85-Untereinheit der PI3K binden (225) und sie aktivieren, woraufhin diese die Akt aktiviert, was sich als anti-apoptotischer und somit pro-tumorigener Mechanismus gezeigt hat

(226). Abbildung 10 zeigt vereinfacht das durch Integrine aktivierte FAK-Signaling unter Berücksichtigung der möglichen Interaktionen mit Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK).

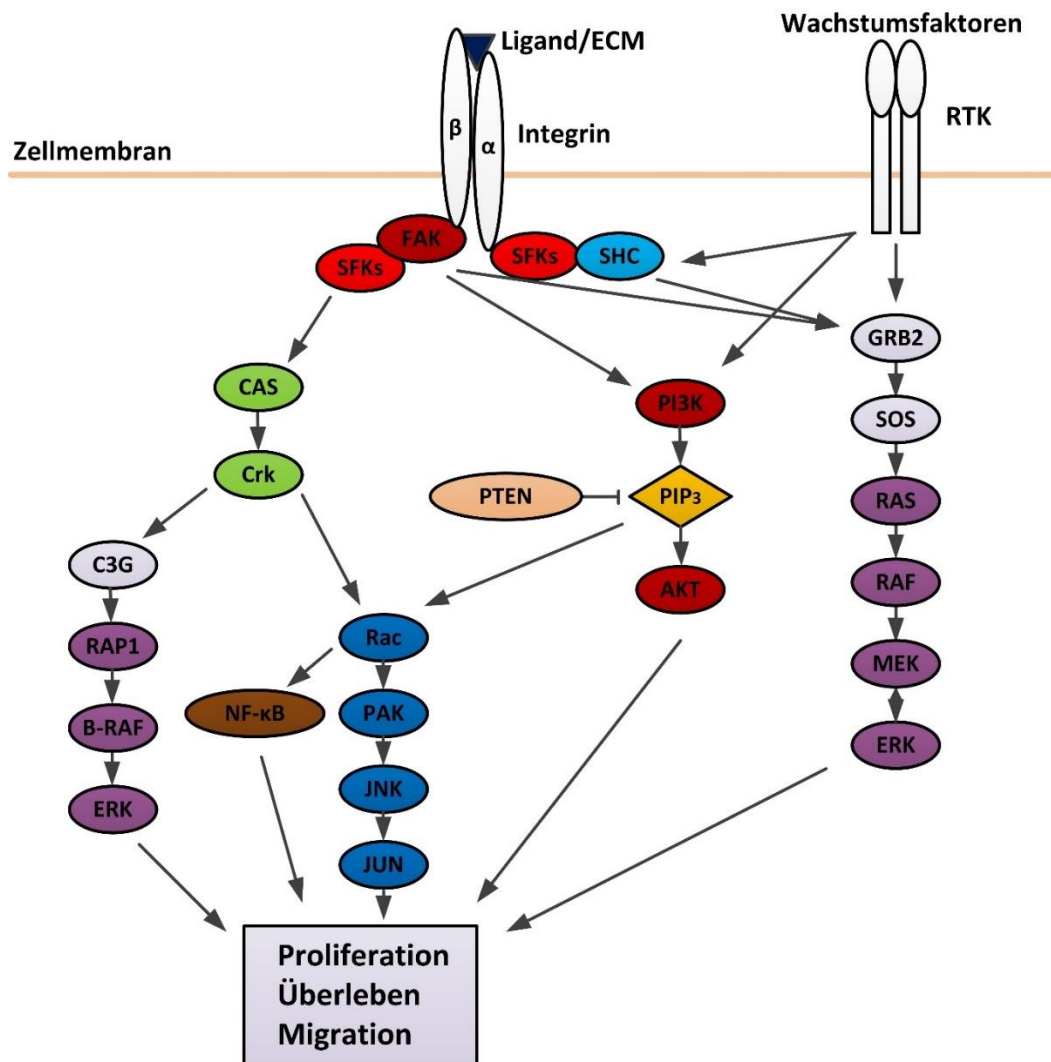


Abbildung 10: Schematisch vereinfachte Darstellung des FAK-Signalweges. Modifiziert nach Guo et al. (224).

Eine besondere Rolle wird dabei der PI3K und ihren nachgeschalteten Effektoren zuteil, allen voran der Akt, da gerade diese Kinasen in malignen Erkrankungen zu den am häufigsten Entarteten zählen (227). Detaillierter betrachtet bildet die PI3K eine Oberfamilie aus Serin/Threonin-Kinasen, in der als Heterodimere eine katalytische p110-Untereinheit und eine regulatorische meist p85 (oder p101)-Untereinheit miteinander verbunden sind. Sie phosphorylieren Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP3). Als Gegenregulator fungiert das Phosphatase- und Tensin-Homolog (PTEN), was PIP3 wieder in PIP2 überführt (228).

PIP3-Generierung ist essentiell für die Rekrutierung der 3-Phosphoinositid-abhängigen Proteinkinase 1 (PDK-1) und der Akt zur Zellmembran und der anschließenden Phosphorylierung der Akt durch PDK-1 an Tyr 308. Für eine vollständige Akt-Aktivierung ist zusätzlich die Phosphorylierung eines konservierten Serin-Rests innerhalb der katalytischen Domäne erforderlich (229). Die Akt steuert selbst eine Vielzahl weiterer Effektorproteine, von denen an dieser Stelle die Gsk3- β gesondert betrachtet werden soll.

2.3.4.3. Rolle der Gsk3- β

Die Gsk3- β ist ebenfalls eine Serin/Threonin-Kinase und liegt in einer α - und einer β -Form vor. Die Expression der beiden Isoformen ist dabei gewebeabhängig, aufgrund der hohen Sequenzhomologie der katalytischen Domäne phosphorylieren sie aber dieselben Zielstrukturen. Die Phosphorylierung an Ser 21/Ser 9 des N-terminalen Endes der Gsk3- α/β durch die Akt führt zu einer Deaktivierung der Gsk3- α/β (230). Als zweite Phosphorylierungsstelle mit Einfluss auf die katalytische Aktivität wurde Tyr 216 identifiziert, was die Aktivität des Enzyms auf das bis zu 200fache steigern kann (231). Ihren Namen verdankt die Gsk3 der Tatsache, dass sie zuerst im Zusammenhang der insulinvermittelten Signalkaskade beschrieben wurde (die interessanterweise über PI3K/Akt die Gsk3 phosphoryliert). Die Inhibierung der Gsk3 führt hier zu einer Aktivierung der Glykogensynthase, was die Protein- und Glykogen-Produktion steigert (232).

Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Gsk3 auch als Schlüsselmolekül in weiteren Signalwegen aktiv ist. Hierzu gehören der Wnt-Signalweg, MAPK-Signalweg und der PI3K/Akt-Signalweg. Zwischen diesen Signalwegen bestehen Quervernetzungen, wie zwischen dem PI3K/Akt-Signalweg und dem Wnt-Signalweg (233–238). Zusätzlich bedingt eine Akt-Aktivierung die β -Catenin-Akkumulierung, während sie gleichzeitig für die Gsk3- β -Inaktivierung verantwortlich ist (239,240). Es ist nicht abschließend geklärt, wie genau diese Prozesse zusammenhängen, da in insulinvermittelten (also über Wachstumsfaktor-Rezeptoren) PI3K/Akt-*signaling*-Prozessen eine Deaktivierung der Gsk3- β über das Ser 9 nicht zu einer Wnt-Aktivitätssteigerung führt (241). Die Gsk3- β ist in diesem Zusammenhang deshalb so wichtig, da sie zentraler Bestandteil des zweiten für diese Arbeit wichtigen Signalweges, dem Wnt-Signalweg, ist.

2.4. Wnt-signaling

Die Entdeckung des Wnt-Signalweges als pro-tumorigen wurde das erste Mal für das WNT1-Gen in Mäusen beschrieben. Nach der Insertion viraler DNS und der Identifizierung des Int1-Abschnittes als eine dominante virale Integrationsseite, aus der sich Mammakarzinome entwickelten, schlussfolgerten Nusse et al. auf die Entdeckung eines neuen Onkogens (242). Int1 wurde später in WNT1 umbenannt aufgrund der Sequenzhomologie zum *Wingless*-Gen (243). Bis zum heutigen Tage hat sich die Liste der durch die *Wingless-related integration site* codierten Wnt-Glykoproteine in Säugetieren auf 19 erweitert. Diese übernehmen unterschiedliche Rollen in der embryonalen Entwicklung, der Zellproliferation, dem Zellüberleben, der Migration und der Stammzellentwicklung, um nur einige zu nennen (244). Schnell erkannte man, dass Wnt1 die Stabilisierung von freiem β -Catenin begünstigt, was eine Relokalisation in den Nukleus und die β -Catenin-gesteuerte Transkription bedingt (245). Allerdings ist heutzutage bekannt, dass auch β -Catenin unabhängiges Wnt-signaling existiert. Man spricht in diesem Zusammenhang vom *canonical* Wnt-signaling, wenn man β -Catenin-abhängiges signaling meint und vom *non-canonical*, wenn β -Catenin nicht beteiligt ist. Für diese Arbeit ist nur das *canonical* Wnt-signaling von Bedeutung, weshalb im Folgenden nur Moleküle und Mechanismen dieses Signalweges erläutert werden.

2.4.1. Aktives Wnt-signaling

Schreitet man die Signalkaskade von außen nach innen ab, in der Reihenfolge der natürlichen Aktivierung, so startet das *signaling* mit der Sekretion von Wnt-Glykoproteinen, die als Liganden an den Frizzled-Rezeptor binden. Die Wnt-Glykoproteine enthalten mehrere konservierte Cysteine und weisen eine posttranslationale Modifikation auf, bei der eine Fettsäure an einen konservierten Serinrest bindet. Im Falle des ersten charakterisierten Wnt-Glykoproteins Wnt3a handelt es sich um eine Palmitinsäure. Diese Lipidmodifikation zeigt sich verantwortlich für die intrazelluläre Prozessierung und Sekretion sowie für die Vermittlung von effektivem *signaling* (246). Bereits 2012 konnte die Kristallstruktur für die Bindung zwischen Wnt8 und seinem Bindungspartner, dem Frizzled-Rezeptor (Fzd), aufgeklärt werden, wobei sich herausstellte, dass die Palmitinsäure-Modifikation in einer der beiden Bindungsseiten

enthalten ist (247). Die Modifikation erfolgt im endoplasmatischen Retikulum durch die O-Acyltransferase Porcupine (PORC) (248). Nach der Sekretion erfolgt eine Bindung an das hydrophobe n-terminale Ende des Fzd, der einen heterodimeren Rezeptorkomplex mit dem *low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6* (LRP 5/6) ausbildet. Der Bindung folgend wird eine Signalkaskade angestoßen, in deren Folge der LRP phosphoryliert wird durch die Gsk3- β und die *casein kinase 1 α* (CK1 α). Das führt zur Rekrutierung und Polymerisierung von *dishevelled* (DVL) an der Zellmembran. Dieser Vorgang deaktiviert den *destruction complex*, indem es ihn bspw. in Vesikeln akkumulieren lässt und somit die einzelnen Komponenten räumlich von ihren Substraten trennt (249). Gleichzeitig führt die Phosphorylierung des LRP 6 auch zu einer Akkumulation und Bindung von Axin am LRP 6. Interessanterweise handelt es sich bei dem phosphorylierten Motiv (PPPSP) im LRP 6 um dasselbe Motiv, das auch der Phosphorylierung von Axin, β -Catenin und APC durch die Gsk3- β bedingt (250).

Anschließend kann β -Catenin im Zytoplasma akkumulieren, in den Zellkern wandern und dort an den Transkriptionsfaktor *T-cell factor/lymphoid enhancer factor* (TCF/LEF) binden. Durch diesen Vorgang wird Groucho/TLE aus seiner Bindung an TCF/LEF verdrängt und weitere Histon-modulierende Co-Aktivatoren werden rekrutiert, darunter CBP/p300, BRG1, BCL9 und Pygo (251). Der so geformte Transkriptionskomplex transkribiert die *wnt-targeted genes* (252). Da in Wirbeltieren vier unterschiedliche Gen-Loci für TCF mit unterschiedlichen Promotorregionen und alternativen mRNA-*splice*-Varianten gefunden wurden, erklärt sich die hohe Heterogenität innerhalb dieser Transkriptionsfaktorfamilie und verdeutlicht, weshalb die Aktivierung des *canonical* Wnt-Signalweges von variierender Bedeutung im zellulären Kontext sein kann (253). Beispielhaft hierfür ist, dass die Phosphorylierung von TCF3 durch HIKP2 in Anwesenheit von β -Catenin zu einer Dissoziation des TCF3 von der Promotorregion führt, was zu einer Aktivierung durch Bindung eines anderen aktivierenden TCF führen kann. Derselbe Mechanismus könnte gleichzeitig aber auch für die Inhibierung aktiver Transkriptionsfaktoren wie LEF1 sorgen und damit deaktivierend wirken (254). Das aktive Wnt-*signaling* ist in Abbildung 11 rechts beschrieben.

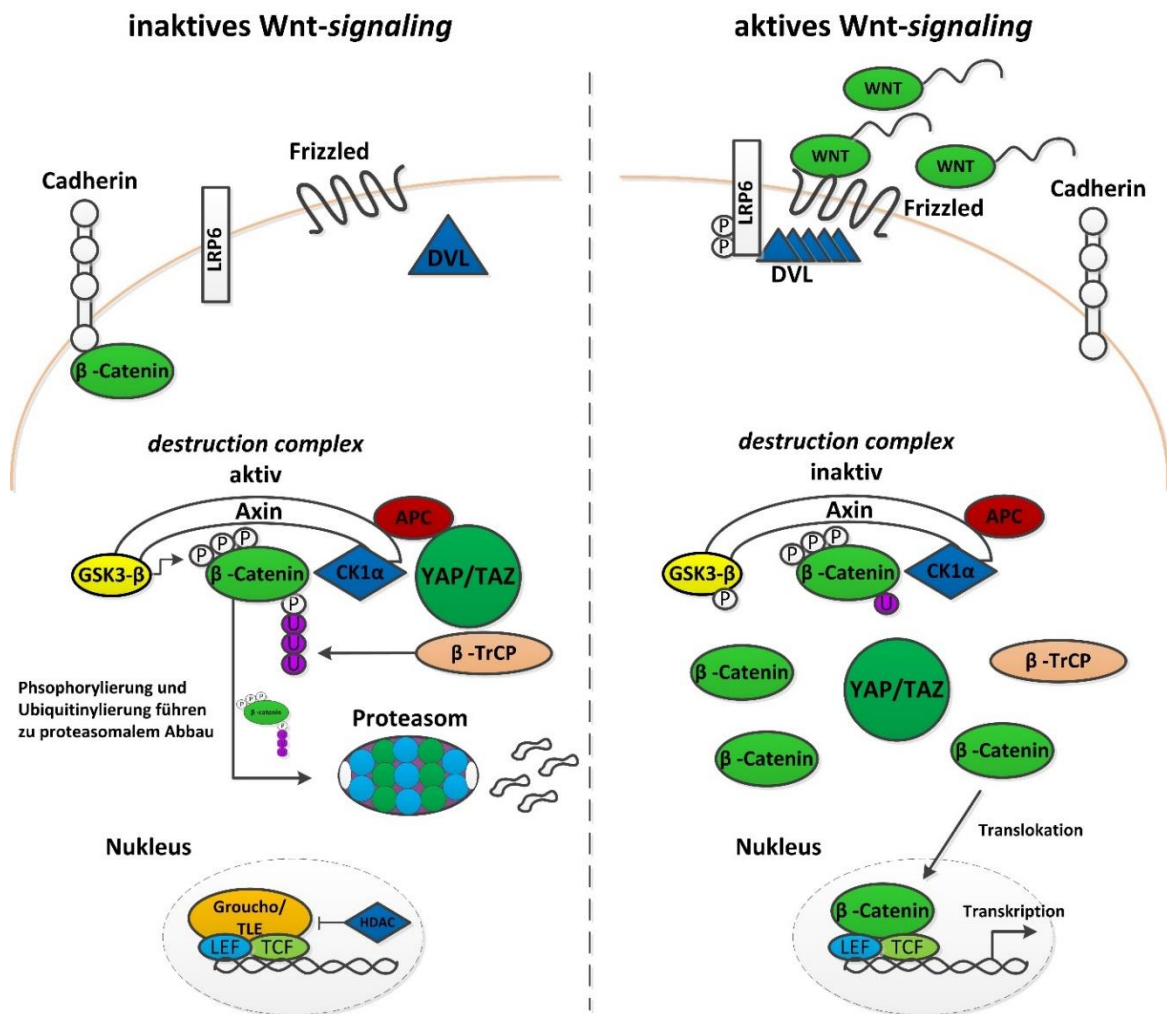


Abbildung 11: Schematisch vereinfachte Darstellung des *canonical* Wnt-Signalweges im aktiven und inaktiven Zustand. Modifiziert nach Zhan et al. (249).

2.4.2. Inaktives Wnt-signaling

Im inaktiven Zustand (Abbildung 11 links) bildet sich der bereits erwähnte *destruction complex* aus, dessen Funktion die Degradierung von β -Catenin durch Phosphorylierung und Ubiquitinylierung mit anschließendem proteasomalem Abbau ist. Wie zuvor bereits erläutert ist die Gsk3- β ein integraler Bestandteil des *destruction complex*, neben dem Tumorsuppressor Axin, der Ser/Thr Kinase CK1 α , dem YAP/TAZ-Komplex und der E3-ubiquitin-Ligase β -TrCP als Hauptregulatoren (240). Dabei umfasst die Phosphorylierung des β -Catenin drei wichtige Schritte. In einem ersten Schritt erfolgt die Phosphorylierung an Ser 45 durch die CK1 α , bevor anschließend durch die Gsk3- β Thr 41, Ser 37 und Ser 33 phosphoryliert werden. Abschließend erfolgt die Ubiquitinylierung durch die β -TrCP, welche die n-terminalen Ser 37 und Ser 33 erkennt (255). Es erfolgt der

proteasomale Abbau. Für die Ausbildung des Komplexes und die effektive Ausführung der Phosphorylierung sind strukturgebende Proteine nötig, die man auch als *scaffold*-Proteine bezeichnet. Dazu gehört das Axin, welches für den *destruction complex* strukturgebend ist, da es Bindungsstellen für CK1 α , Gsk3- β und β -Catenin besitzt (256). Die räumliche Nähe sorgt für eine Forcierung der β -Catenin-Phosphorylierung. Da für beide Kinasen beschrieben ist, dass die Axin-Bindungsstelle abseits der katalytischen Domänen von CK1 α und der Gsk3- β liegt, können weitere aktivitätssteigernde Mechanismen durch Axin ausgeschlossen werden (257,258). Zusätzlich besitzt Axin eine Bindungsstelle für APC und die Wechselwirkung zwischen den beiden Partnern ist notwendig für die APC-Phosphorylierung (259). Die genaue Rolle von APC ist dabei noch ungeklärt, man geht aber davon aus, dass die APC-Bindung an Axin die Bindung von Axin zu β -Catenin erleichtert. APC ist somit ein weiteres *scaffold*-Protein, dessen Aktivität sich nicht direkt auf die Phosphorylierung des β -Catenin auswirkt. Zusätzlich werden weitere APC-Funktionen diskutiert, bei denen die Phosphorylierung von APC 20-mer-Sequenzwiederholungen, Axin aus seiner β -Catenin Bindung verdrängt und somit freies Axin für die Bildung neuer *destruction complex*-Einheiten generiert (260). Auch eine Rolle im Prozess der Ubiquitylierung durch β -TrCP wird dem APC zugesprochen (261). Die Transkriptionsregulatoren YAP/TAZ gehören zum Hippo-Signalweg und wurden erst vor kurzem als Teil des *destruction complex* identifiziert (262). Man geht von einer dualen Rolle im Wnt-*signaling* aus, bei der YAP/TAZ für die Rekrutierung von β -TrCP zum *destruction complex* verantwortlich ist und in freier Form nach Wnt-Aktivierung als positiver Regulator der Wnt-Transkription fungiert (249).

2.4.3. Rolle des Wnt-*signaling* in Krebserkrankungen

Der Wnt-Signalweg bzw. seine Mutationen spielen in vielen Krebserkrankungen eine zentrale Rolle, sowohl für die Ausbildung, als auch für Erhalt und Progression der Krankheit. Im Fokus der Untersuchungen stehen u.a. gastrointestinale Krebserkrankungen, Leukämie, Brustkrebs und Melanome, wobei Letztere von besonderem Interesse für diese Arbeit sind. Bereits in der embryonalen Entwicklung von Melanomzellen nimmt Wnt-*signaling* eine entscheidende Rolle ein. Zellen der Neuralleiste migrieren mithilfe von Stimuli des Wnt-Signalweges und differenzieren sich u.a. zu Melanozyten aus. Welche Ausdifferenzierung eine Zelle der Neuralleiste später

durchläuft ist dabei von dem *microphthalmia transcription factor* (MITF) abhängig, der eine β -Catenin-Abhängigkeit zeigt, da er zu den Wnt-Zielgenen gehört (263). Zellen mit einem hohen MITF-Anteil bilden Melanozyten, welche für die Hautpigmentierung verantwortlich sind. Für diesen Prozessablauf ist die Aktivierung des cAMPK/PKA-Signalweges notwendig. Dieser kann die Gsk3- β deaktivieren und β -Catenin stabilisieren (264). Wnt-*signaling* und die Stabilisierung von β -Catenin spielen des Weiteren eine wichtige Rolle in der Umgehung der Einleitung von Seneszenz in malignen Melanomen.

Üblicherweise vermeiden Melanomzellen den Übergang in die Seneszenz durch einen Verlust der Expression des Tumorsuppressorproteins p16^{INK4a} als Folge einer Mutation. Auch in Abwesenheit einer p16^{INK4a}-Mutation durch Stummschaltung der p16^{INK4a}-Expression über β -Catenin ist eine Seneszenzvermeidung in Melanomzellen möglich. Diesem Vorgang liegt vermutlich eine Verbindung aus MAPK- und Wnt-*signaling* zugrunde. Rund 50 % aller Melanome weisen eine B-RAF-Mutation und ca. 30 % eine Wnt-Aktivierung auf, was Synergismen therapeutisch relevant macht (255).

Weitere Arbeiten implizieren, dass neben der gegenseitigen Beeinflussung zwischen Wnt- und MAPK- auch PI3K/Akt-*signaling* involviert sein kann (265,266). Dabei kann die Expression von Wnt-Zielgenen wie dem MITF eine PI3K/Akt- und MAPK-Aktivierung in solchen Zellen bedingen, die einen Verlust an PTEN und eine Überaktivierung an BRAF sowie eine stabile β -Catenin-Expression aufweisen. Dies führt zur Bildung aggressiv metastasierender Tumore. Alterniert man jedoch die Mutationen dieses artifiziellen Zellsystems, indem man bspw. nur die BRAF Mutation einführt, so zeigt sich zwar eine starke Ausdifferenzierung des Tumors, aber nur geringes metastatisches Potential (265). Im Kontext dieser und weiterer Befunde (267) überrascht es nicht, dass die Rolle von Wnt-*signaling* und insbesondere β -Catenin überaus komplex ist und kontrovers diskutiert wird (264,265,268). Die Verschaltung mehrere Signalwege über den Wnt-Signalweg in Sekundärresistenzen macht eine Betrachtung im Kontext der Primärresistenz interessant, da hier die gleichen Verknüpfungen ohne das Vorliegen genetischer Mutationen angesprochen werden können.

Betrachtet man nun Brustkrebserkrankungen zeigt sich, dass in vielen Mammakarzinomen Wnt-*signaling* aktiv ist, was mit einer reduzierten Gesamtüberlebensdauer korreliert (269,270). Vor allem in *triple*-negativen

Mammakarzinomen spielt Wnt eine entscheidende Rolle (271,272). Dabei ist oft nicht eine genetische Mutation für die Aktivierung verantwortlich, sondern viel mehr die Überaktivierung durch eine erhöhte Expression an Wnt-Liganden bzw. eine erhöhte Rezeptordichte oder die Aktivierung durch andere Signalwege (270). Aktuelle Studien in *triple*-negativen und HER2-positiven Mammakarzinomen belegen, dass der Einsatz von Wnt-Inhibitoren auch in Kombination mit klassischer Chemotherapie einen vielversprechenden Ansatz bilden, was die Relevanz dieses Signalweges in Brustkrebserkrankungen unterstreicht (273–275). Dies zeigt sich auch, wenn man die zahlreichen Inhibitoren des Wnt-Signalweges in der klinischen Untersuchung u.a. in Brustkrebspatienten betrachtet. Dazu gehören OMP18RS (Vantictumab), welches bereits eine Phase-1-Studie durchlaufen hat (NCT01973309) und als Zielstruktur unterschiedliche Fzd-Rezeptoren bindet und inhibiert, sowie Foxy 5, einem Wnt5a-Analogon, das die antimetastatische Wirkung von Wnt5a reproduzieren soll und bereits in Phase1 getestet wurde (NCT02655952). Sowohl in Melanom- als auch in Brustkrebspatienten wird der Porcupine-Inhibitor LGK974 getestet (NCT01351103). Pyrivinium als CK1 α -Inhibitor hat bereits als Antihelminthikum eine Zulassung durch die FDA erhalten und ist damit prädestiniert für klinische Untersuchungen in Wnt-abhängigen Krebserkrankungen (276).

2.4.4. E-Cadherin im Kontext von Wnt und EMT

E-Cadherin gehört der Gruppe der Cadherine an, einer Superfamilie transmembranärer Proteine, die vorwiegend in den sogenannten *tight-junctions* der Zelle lokalisiert sind. Über ihre Calciumbindungsstellen vermitteln sie die calciumabhängige Zelladhäsion und bilden intrazellulär Verbindungen zu β -Catenin, α -Catenin sowie dem Zytoskelett aus (277). E-Cadherin selbst wird als ca. 130 Aminosäuren-großes Propetid gebildet und reift dann zu einem etwa 728 Aminosäuren-großen Polypeptid aus. Dieses gereifte Peptid besteht aus einer transmembranären, einer zytoplasmatischen und einer extrazellulären Domäne. Die extrazelluläre Domäne besitzt sogenannte extrazelluläre Cadherin-Wiederholungen, die wichtig sind für die Ausformung von Zell-Zell-Kontakten. Die zytoplasmatische Domäne kann in zwei Subdomänen unterteilt werden: die näher der Membran lokalisierten, konservierten Domäne (MPCD) und der β -Catenin bindenden Domäne (CBD). Die Assoziation mit β -Catenin wird dabei über eine direkte Bindung der

Armadillo-Sequenz an eine C-terminale Kernstruktur des E-Cadherin realisiert. Dafür wichtig sind Cluster von acht Serinresten, deren Phosphorylierung durch die Gsk3- β und die CK2 abläuft. Diese Phosphorylierung steigert in hohem Maße die Affinität des E-Cadherin gegenüber dem β -Catenin (278). Weitere Proteine wie APC sind in die Bindung und ihre Bildung sowie Auflösung involviert, was zu einem komplexen Netzwerk führt. Dies ist insofern von Bedeutung, als dass E-Cadherin neben seiner Rolle als Bindungsmediator auch Funktionen in ablaufenden Signalprozessen innerhalb der Zelle übernimmt. Diese Funktion kann mit E-Cadherin selbst verbunden sein (direkte Signalweiterleitung), z.B. über die physische Wechselwirkung mit Tyrosinkinase wie dem EGFR (279), oder indirekt über das gebundene β -Catenin (280). Die Freisetzung des gebundenen β -Catenin kann zu einer vom normalen Wnt-*signaling* abweichenden Aktivierung von TCF/LEF führen. Diese Aktivierung steuert unter anderem die Expression von SNAIL, was eine EMT induzieren kann, in deren Verlauf E-Cadherin verloren geht. Hinzu kommt, dass SNAIL selbst in einer positiven Feedbackschleife die Transkription durch β -Catenin beeinflussen kann (281,282). Neben dem Verlust an E-Cadherin durch SNAIL-Expression ist sowohl eine integrinvermittelte RTK- und SFK-Aktivierung, als auch die darauffolgende Zell-Zell-Kontakt-Disruption dazu in der Lage, die Internalisierung und Degradierung von E-Cadherin zu forcieren. Dabei ist die Ubiquitinierung durch die Cbl-ähnliche E3 Ubiquitin-Protein-Ligase Hakai für die Endozytose des E-Cadherins verantwortlich (224). In diesem Zusammenhang konnte auch nachgewiesen werden, dass eine Korrelation zwischen dem Clustern von Integrinen und E-Cadherin, sowie β -Catenin-Lokalisation und -Funktion besteht. Die Zusammenlagerung von Integrinen führt zu einer Störung der *adherens junctions*, was zur Folge hat, dass E-Cadherin internalisiert wird und β -Catenin freigesetzt wird (283).

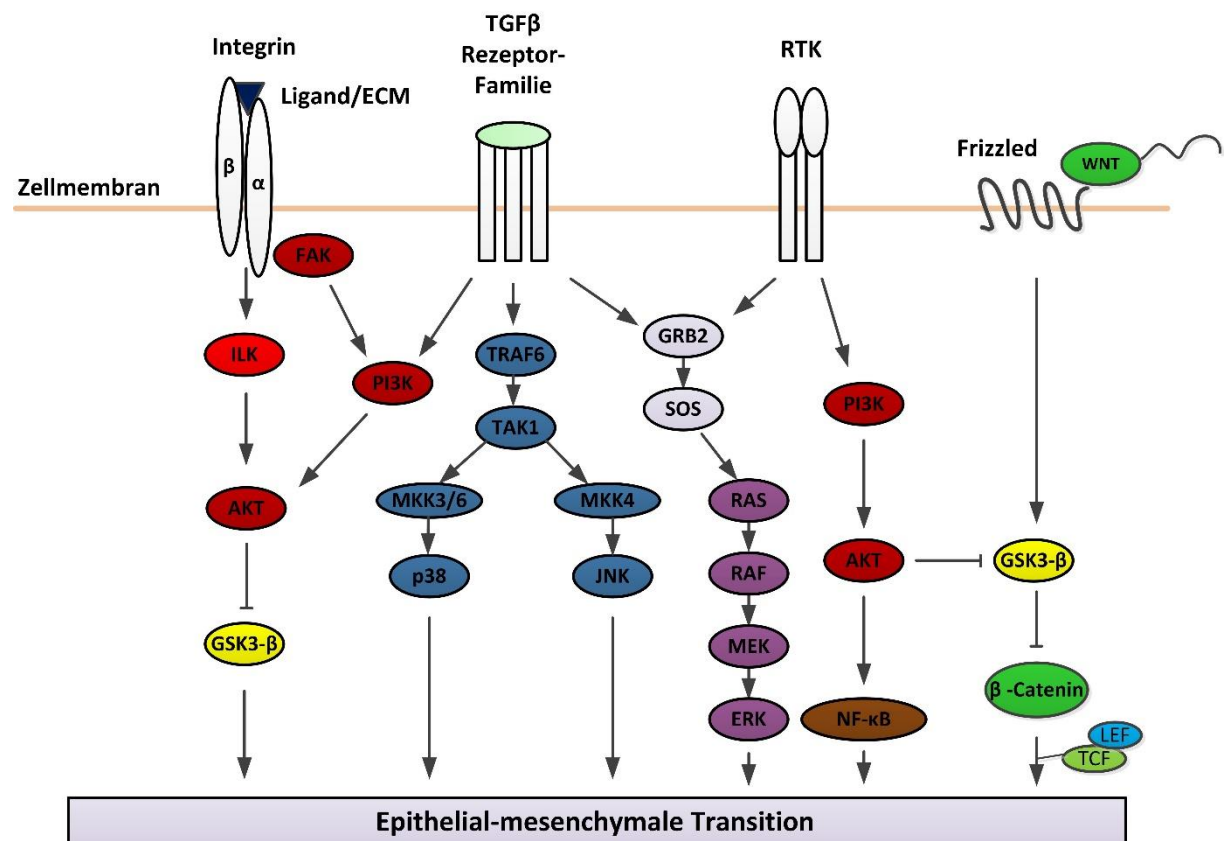


Abbildung 12: Schematische Darstellung von Rezeptoren und nachgeschalteten Signalwegen, die eine EMT induzieren können. Modifiziert nach Lamouille et al. (284).

Der Verlust von E-Cadherin unter gleichzeitiger Zunahme von Vimentin dient dabei oft als Marker für das Durchlaufen einer Phenotypänderung von epithelialer zu mesenchymaler Zellcharakteristik. Wie eingangs bereits beschrieben bezeichnet man diesen Prozess als EMT. Stark vereinfacht lässt sich dieser Vorgang wie folgt beschreiben: initial geben die Zellen ihre Zell-Zell-Kontakte auf (*adherens junctions*, *desmosomes*, *tight junctions* und *gap junctions*) und vermindern die Expression epithelialer Gene (z.B. E-Cadherin), während die Expression mesenchymaler Gene (z.B. Vimentin) gesteigert wird. In einem nächsten Schritt gewinnt die Zelle an Motilität, indem sie ihre zytoskelettale Actin-Architektur neu organisiert, Lamellipodien und andere invasive Kapazitäten ausbildet und Metalloproteinasen (MMPs) exprimiert, welche die ECM abbauen (284). Die Transformation sekundärer Epithelzellen in Tumorzellen kann diese dazu befähigen zu einem späteren Zeitpunkt eben jene EMT zu durchlaufen, wodurch diese Zellen dazu in die Lage versetzt werden, invasive Kapazitäten auszubilden und zu metastasieren. Man bezeichnet in diesem Kontext die EMT als Typ 3 EMT, um

sie von der Typ 1 (EMT im Kontext der Embryogenese) und Typ 2 (Gewebsregeneration und Fibrose) abzugrenzen. (285).

2.5. MAPK-signaling

Als MAPK-signaling bezeichnet man eine Signalweiterleitung durch die mitogenaktivierte Proteinkinase (MAPK). Man unterscheidet dabei vier unabhängige MAPK-Signalwege voneinander: den klassischen Weg über die *extracellular signaling related* Kinase (ERK auch MAPK/ERK), die große MAP Kinase-1 (BMK-1), die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) und die p38 *signaling*-Familie. Ihnen gemeinsam ist der analoge Aufbau aus zwei vorgeschalteten Kinasen, die als MAPKKK und die MAPKK bezeichnet werden. MAPKKKs sind Ser/Thr-Kinasen, die wiederum MAPKKs aktivieren, welche doppelspezifische Thr/Tyr-Kinasen sind und ihrerseits MAPKs aktivieren. Im klassischen MAPK-Signalweg bedeutet dies, dass die MAPKKKs A-RAF, B-RAF, RAF-1 oder C-RAF die MAPKKs MEK1 und MEK2 (MEK1/2) aktivieren, welche ihrerseits die MAPKs ERK1 und ERK2 (ERK1/2) aktivieren (286). MEK1/2 werden ubiquitär in menschlichen Geweben exprimiert und phosphorylieren nahezu ausschließlich ERK1/2 als Substrat. Dabei bestehen MEK1/2 aus drei funktionalen Domänen: der N-terminalen Domäne, die unter anderem die Bindung von ERK1/2 zur Phosphatübertragung vermittelt, der Proteinkinase-Domäne und die C-terminale Domäne. Innerhalb der Proteinkinase-Domäne befinden sich zahlreiche Phosphorylierungsstellen, von denen vor allem Ser 218/222 in MEK1 und in gleicherweise Ser 222/226 in MEK2 für die MEK1/2-Aktivierung verantwortlich sind. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die beiden Kinasen in ihrer aktiven Form dimerisieren können, und dass dieser Prozess mit entscheidend für die nachfolgende ERK-Aktivierung sein kann (287). Die Inhibierung von MEK1/2 erfolgt in dieser Arbeit unter Verwendung des nicht-kompetitiven (in Bezug auf ATP und ERK) Inhibitors U0126 (288), der sich *in vitro* als überaus potent erwiesen hat (289) und die MEK1/2 Aktivierung blockiert (290).

Die Aktivierung von ERK1/2 hingegen beeinflusst zahlreiche *downstream*-Substrate, die für die Zellproliferation verantwortlich sind, indem sie Einfluss nehmen auf im Zytoplasma lokalisierte Effektoren. Dazu zählen die ribosomalen S6-Kinasen (RSKs),

welche die Gsk3- β phosphorylieren und somit deaktivieren können. Neben dieser zytoplasmatischen Effekte hat die ERK auch Einfluss auf Transkriptionsfaktoren. Nach Translokation in den Nukleus der Zelle stimuliert sie Aktivatoren der Zellproliferation. Dabei scheinen die finalen Effekte des klassischen MAPK-Signalweges einer Zeitabhängigkeit unterworfen zu sein und die zelluläre Antwort somit auch von Dauer und Art der Aktivierung abzuhängen (291). ERK1 und ERK2 übernehmen grundsätzlich dieselben Funktionen innerhalb der Zelle und zeigen einen ähnlichen Aufbau wie die zuvor beschriebenen MEK1/2, bezüglich ihres C-Terminus, N-Terminus und der Proteinkinase-Domäne. Für die Aktivität der ERK1/2 ist die Phosphorylierung an Thr202/Tyr204 durch MEK1/2 entscheidend, worauf die Substratbindung und die katalytische Aktivität (über ATP-Bindung und Phosphorylgruppen-Übertragung) ermöglicht werden (292). Sowohl die zytosolische als auch die nukleäre ERK1/2-Aktivität unterliegt dabei weiterer Feinregulierung bspw. durch *Sprouty* und *Spred*, welche ERK1/2 im Zytoplasma dephosphorylieren und somit seine Aktivität senken (293). Zur Inhibierung der ERK1/2 wurde in dieser Arbeit der Inhibitor SCH772984 eingesetzt, welcher kompetitiv an die ATP-Bindungsstelle von ERK1/2 bindet (294).

2.5.1. Das *cAMP response element binding protein* (CREB)

Eine wichtige indirekte Zielstruktur des MAPK/ERK-Signalweges ist das *cAMP-response element binding protein* (CREB). Obwohl es alternative *splicing* Varianten gibt, werden alle Isoformen in den meisten Geweben gleich exprimiert und übernehmen dieselben Funktionen (295). Die Primärstruktur weist vier funktionale Domänen auf. Die Q1 Domäne ist verantwortlich für die transkriptionelle Aktivität und liegt benachbart zur Kinase-induzierbaren Domäne (KID). Die glutaminreiche Q2 Domäne ist für die konstitutive Aktivierung verantwortlich und die Basis-Region/Leucin-Zipper Domäne vermittelt die DNS Bindung. Für die DNS-Bindung an das CRE-Motiv 5'-TGACGTCA-3' ist zuvor die Dimerisierung von CREB erforderlich (296,297). Innerhalb der Kinase-induzierbaren Domäne befindet sich ein Serinrest an Position 133, welcher durch Phosphorylierung mittels zahlreicher Kinasen die CREB-Aktivität steuert. Dazu gehören die Akt, die p90RSK und einige weitere Kinasen (298). Weitere Phosphorylierungsstellen finden sich an Ser 129 und Ser 142, die vermutlich die Transkriptionsaktivität von CREB beeinflussen können. Nach der Aktivierung bindet CREB an das CREB-Bindeprotein

(CBP), einen benötigten Co-Aktivator für die Transkription (299). Abbildung 13 zeigt die möglichen Effekte CREB-induzierter Transkription, sowie die Primärstruktur und mögliche Phosphorylierungsstellen.

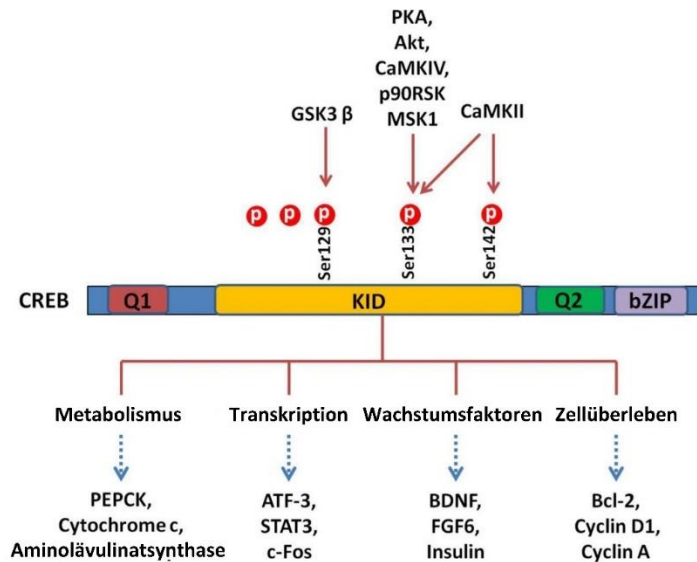


Abbildung 13: CREB-Struktur, Phosphorylierungsstellen und *downstream*-Zielstrukturen. Modifiziert nach Wang et al. (299).

Ein erster Hinweis auf die Bedeutung von CREB in Tumorerkrankungen kam dabei von der Entdeckung eines Fusionsproteins in Klarzellsarkomen weicher Gewebe, welche die konstitutive Expression CREB-aktivierter Gene zur Folge hatte (300). Weitere Untersuchungen zeigten eine Korrelation zwischen den pCREB-Leveln in verschiedenen Krebsformen und ihrer Ausdifferenzierung und Metastasierung (301–303). Nachfolgende Studien beschäftigten sich auch mit der Frage, ob eine CREB-Inhibition in malignen Erkrankungen von Erfolg sein könnte. Die Entwicklung von CRE-Oligonukleotiden, die innerhalb der Zelle CREB binden und somit inaktivieren, zeigte Erfolge in entarteten MCF-7-Brustkrebszellen bei geringer Toxizität in normalem Gewebe (304). Dieser Ansatz führte auch zur Entwicklung von Inhibitoren auf molekularer Ebene, die zahlreiche *small molecule* Verbindungen mit besseren pharmakologischen Profilen hervorbrachte, verglichen mit den genetisch basierten Ansätzen der CREB-Inhibierung (305). Der in dieser Arbeit verwendete CREB-Inhibitor 666-15, der die CREB-Phosphorylierung an Ser 133 unterbindet, verhindert somit die Interaktion zwischen CREB und CBP (306).

2.5.2. Rolle des MAPK-signaling in Krebserkrankungen

Betrachtet man die Relevanz von MAPK-signaling in der Krebstherapie so fällt auf, dass vor allem Melanomzellen häufig eine aktivierende Mutation des B-RAF- oder N-RAF-Gens aufweisen (307,308). Wie oben bereits erwähnt geht dabei eine B-RAF-Aktivierung häufig mit einem Verlust an PTEN einher, der im Zusammenspiel mit β -Catenin zu einer MITF-Expriemierung führt. Auch B-RAF-unabhängiges MAPK-signaling kann zu einer MITF-Deregulation führen (263). Da MITF selber als therapeutische Zielstruktur nur schlecht zugänglich ist (263) und eine Überexpression zur Resistenz gegenüber MAPK-Inhibitoren führen kann (309), werden immer wieder neue Wege eingeschlagen um die Resistenzen von Melanomen in den Griff zu bekommen, darunter oftmals die Kombination eines MAPK-Inhibitors mit weiteren Therapieoptionen wie bspw. HDAC-Inhibitoren (310,311). Zahlreiche MAPK-Inhibitoren finden sich zu diesem Zweck derzeit in der klinischen Prüfung, darunter die MEK-Inhibitoren Binimetinib bei Melanomen (NCT01909453, NCT01763164) und GSK1120212 in Brustkrebs (NCT01467310), sowie die ERK-Inhibitoren LY3214996 in unterschiedlichen stark vorangeschrittenen Tumoren (NCT02857270) oder auch LY2228820 in Ovarialkarzinomen (NCT01663857). Wie unter 2.1.2.2 bereits erläutert ist dieser Ansatz die neueste leitlinienvvalidierte Therapieoption in Melanomen.

Ein weiterer Indikator für die Kombination verschiedener Inhibitoren kommt aus der Mammakarzinom-Forschung, in der sich gezeigt hat, dass PI3K/Akt und MAPK/ERK sich gegenseitig stimulieren können, unabhängig von einer PTEN-Mutation (312). Der Einsatz von Inhibitoren des MAPK-Signalweges ist dabei ein offensichtlicher Ansatz in HER2-positiven Brustkrebspatienten, da der HER2/neu-Rezeptor mit den anderen HER-Rezeptoren (1,3 und 4) dimerisiert, darunter auch der HER1 (EGFR), und so PI3K/Akt- und MAPK-signaling aktiviert. Trastuzumab als HER2/neu Antagonist wird u.a. mit verschiedenen Tyrosinkinase-Inhibitoren wie Lapatinib (Tyrosinkinase-Inhibitor der Akt und MAPK-inhibiert) kombiniert (14,313). Dabei ist allerdings noch auf einen Durchbruch zu hoffen, da die bisherigen Studienergebnisse einer Trastuzumab-Lapatinib-Behandlung eher kontrovers sind. In der NeoALTTO-Studie zeigte sich ein statistisch signifikantes Ansprechen der Erkrankung auf die Kombination, ohne sich aber auf das Gesamtüberleben auszuwirken (314) und in der NSABP B-41 und CALGB 40601 konnte keine Überlegenheit des Ansprechens einer Dualtherapie gegenüber der Monotherapie

mit Trastuzumab gezeigt werden (314,315). Obwohl Mutationen von RAS/MAPK nur selten in *triple*-negativem Brustkrebs zu finden sind, gibt es Anzeichen, dass auch hier eine Kombinationstherapie unter Inhibierung von MAPK einen Vorteil gegenüber der Monotherapie darstellen könnte (316).

3. Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit ergibt sich aus den Befunden der Dissertationsprojekte von Frau Bethania Piva und Herrn Fabian Baltes, in denen eine Integrin-Aktivierung nachweislich als ein Faktor für die Resistenzbildung in Melanom- und Mammakarzinomzellen nachgewiesen werden konnte. Da neben der Affinitätssteigerung der Integrine über Mangan insbesondere die Integrinbindung an Kollagen als repräsentative Substanz der EZM die Resistenzbildung vermittelt, sind diese Effekte der CAM-DR zuzuordnen. In dieser Arbeit sollen die zugrunde liegenden Mechanismen auf intrazellulärer Signalebene untersucht werden. Ziel ist es damit, neue Targetstrukturen für die Sensitivierung von Tumoren in einer frühen Phase der Resistenzbildung offenzulegen.

Für eine breitere Aussagefähigkeit werden neben der Anwendung von Zellsystemen zweier Tumorentitäten (Melanom und Mammakarzinom) auch die Effekte von Zytostatika unterschiedlicher Wirkstoffklassen untersucht. Aufbauend auf Proteinanalysen der deregulierten zellulären Signalkaskaden unter den beschriebenen Integrinaktivierungen werden hierfür ausgewählte Signalkaskaden gezielt analysiert und in ihrer Bedeutung für die Resistenz erfasst. Um den Einfluss des $\beta 1$ -Integrins für die Vermittlung der Resistenzeffekte besser zu verdeutlichen, werden $\beta 1$ -*knock-down* Zellen erzeugt und hinsichtlich der veränderten Signalaktivität und Einflüsse auf die Zytostatikaresistenz vorgestellt. Anschließend sollen Untersuchungen mit Inhibitoren der zuvor identifizierten Signalwege unter Zusammenführung der vorherigen Ergebnisse Zielstrukturen für Sensitivierungsstrategien aufzeigen. Die so erhaltenden Ansätze und Inhibitor-Kombinationen wurden im Laufe der antitumoralen Forschung bereits intensiv untersucht, die Einordnung und Charakterisierung im Resistenzgeschehen blieb bis jetzt allerdings aus. Anhand dieser Untersuchungen wird sowohl ein *proof of concept* vorgenommen, als auch alternative Modelmechanismen der Resistenzbildung ermittelt. Somit bilden die Ergebnisse dieser Arbeit einen neuen Beitrag zur Aufklärung mechanistischer Vorgänge im CAM-DR-Geschehen und könnten bei der Übertragung von Antitumor-Strategien in die Behandlung chemoresistenter Tumore helfen. Da Phänomene der primären Resistenzbildung untersucht wurden, sind diese Ansätze dabei

sowohl in der Resistenzformation solider Tumore, als auch in der Ausbildung von Resistenzen in Mikrometastasen von Relevanz.

4. Material und Methoden

4.1. Verwendete Materialien

4.1.1. Chemikalien und Ausgangsstoffe

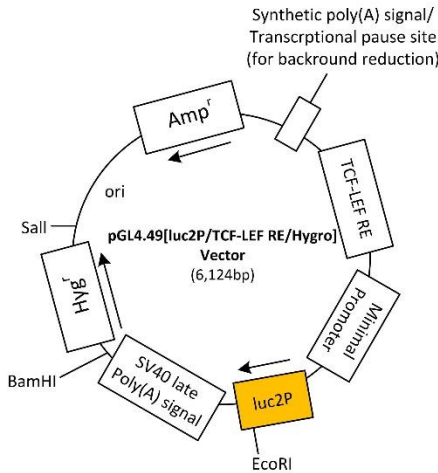
4.1.1.1. Substanzen

Bezeichnung	Hersteller
Aceton	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach
Bacillol® AF	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Bovines Serum-Albumin, BSA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
CASY®ton	Schärfe Systems GmbH, Reutlingen
Cell Extraction Buffer	Thermo Fisher Scientific inc., Waltham, Massachusetts, USA
CellTiter-Fluor™	Promega GmbH, Mannheim
Cisplatin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Clarity™ ECL Western Blotting Substrate	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Collagen I (Rattenschwanz)	Corning, New York, USA
4',6-Diamidin-2-phenylindol, DAPI	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DMEM Nährmedium	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Dimethylsulfoxid, DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid, MTT	AppliChem GmbH, Darmstadt
DPBS ohne Calcium und Magnesium, steril	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Ethanol 96% (V/V)	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach
Fötale Kälberserum F7524	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
FuGENE® HD Transfektionsreagenz	Promega GmbH, Mannheim
Gigasept® Instru AF	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt
Glo Lysis Buffer	Promega GmbH, Mannheim
L-Glutamin-Lösung (200 mM)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (100X)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Hygromycin B Gold	Invivogen, Toulouse, Frankreich

Isopropanol 100%	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach
Kohlenstoffdioxid	AIR LIQUIDE Deutschland GmbH, Düsseldorf
Kupfersulfat-Pentahydrat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Laemmli-Probenpuffer, 2× Konzentrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Laemmli-Probenpuffer, 4× Konzentrat	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Lithiumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Mangan(II)chlorid	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach
Melsept® SF	B. Braun AG, Melsungen
Methanol 99,9 %	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach
Milchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumazid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumcarbonat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumchlorid	Grüssing GmbH, Filsum
Natriumcitrat-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydroxid	Grüssing GmbH, Filsum
Natronlauge (1M)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Nuclear/Cytosol Extraction Kit	BioVision, Inc., San Francisco, USA
ONE-Glo™ Luciferase Assay System	Promega GmbH, Mannheim
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin-Lösung (10.000 I.E./mL, 10 mg/mL)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Phenylmethylsulfonylfluorid, PMSF	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Darmstadt
Polybrene	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Precision Plus Protein™ Unstained Standards	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Precision Plus Protein™ Dual Color Standards	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Precision Protein™ StrepTactin-HRP Conjugate	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Proteome Profiler™ Human Phospho- Kinase Array Kit	R&D Systems Europe Ltd., Abingdon, UK
Puromycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Renilla-Glo® Luciferase Assay System	Promega GmbH, Mannheim
Roti®-CELL PBS/EDTA	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
RPMI-1640® Nährmedium	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Salzsäure, (1 M)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Sera Plus	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Stickstoff	Linde AG, Düsseldorf
TRIS-Base	AppliChem GmbH, Darmstadt
Triton X-100	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Trypsin/EDTA-Lösung 0,25%	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Tween™ 20	AppliChem GmbH, Darmstadt

4.1.1.2. Transfektionssysteme

Transfektionssystem	Struktur (falls bekannt)	Hersteller
Signal TCF/LEF Reporter Assay Kit (LUC)	-	Quiagen, Hilden
pGL4.49[luc2P/TCF-LEF/Hygro] Vector		Promega GmbH, Mannheim
Integrin β1 siRNA (h), shRNA und Lentivirale Partikel Gen Silencer Reagenzien	-	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Control shRNA Lentiviral Particles-A	-	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg

4.1.1.3. Inhibitoren

Bezeichnung	Zielstruktur	Hersteller	
FAK 14 Inhibitor	Y397 Autophosphorylierungsstelle der FAK	Cayman Chemicals, Michigan, USA	
IWR1	Axinstabilisator	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	
SCH772984	ERK 1/2 Inhibition durch Inhibierung der Phosphorylierung des ERK- Substrates p90 ribosomal S6 Kinase	Selleck Chemicals, München	
U0126	Allosterischer Inhibitor von MEK 1/2	Hycultec Beutelsbach	GmbH,
666-15	Inhibiert die Bindung von CREB an das CREB Bindepotein (CBP)	Hycultec Beutelsbach	GmbH,

4.1.1.4. Primäre Antikörper

Antikörper	Epitop	Eigenschaften	Hersteller
β-Aktin (C4)	Volle Länge von β- Aktin aus dem Muskelmagen des Vogels (alle Isoformen)	Maus, monoklonal, IgG ₁	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
APC (F3)	Aminosäuren 2-289 des humanen APC	Maus, monoklonal, IgG ₁	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Axin1 (N1-N2), primär	Eine Sequenz der N- Terminus-Region von humanem Axin1	Kaninchen, polyklonal, IgG	Gene Tex Inc., Irvine, USA
β-catenin (H-102)	Aminosäuren 680-781 des C-Terminus	Kaninchen, polyklonal, IgG ₁	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
pCREB (10E9)	Aminosäuren die den Serine-133-Terminus umgeben	Maus, monoklonal, IgG ₁	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg

E-Cadherin (H-108)	Aminosäuren 600-707 der extrazellulären Domäne	Kaninchen, polyklonal, IgG ₁	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
ERK-1/2	Gegen ERK1 und ERK2	Kaninchen, polyklonal, IgG ₁	Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main
p-ERK-1/2 (Thr202/Tyr204)	Doppelt-phosphoryliertes Thr202 und Tyr204 oder einfach-phosphoryliertes Thr202 von ERK1 und ERK2	Kaninchen, monoklonal IgG ₁	Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main
GAPDH (GT239)	Gegen eine zentrale Region des humanen GAPDH	Maus, monoklonal, IgG _{2b}	Gene Tex Inc, Irvine, USA
pGSK-3 β (Ser9)	Ser9 der Phosphorylierungsstelle	Ziege, polyklonal, IgG ₁	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
β 1-Integrin (P5D2)	β 1-Untereinheit humaner Keratinozyten	Maus, monoklonal, IgG ₁	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
LaminB1 (H-90)	Aminosäuren 401-490 nahe des C-Terminus	Kaninchen, polyklonal, IgG	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
p-MEK-1/2 (7E10)	Aminosäuren der T-E-Y Sequenz	Maus, monoklonal, IgG ₁	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
TCF4 (H-125)	Aminosäuren 486-610 nahe des C-Terminus	Kaninchen, polyklonal, IgG	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg

4.1.1.5. Sekundäre Antikörper

Antikörper	Epitop	Eigenschaften	Hersteller
Donkey F(ab') ₂ Anti Goat IgG	Ziegen-IgG Leichtketten	Esel, polyklonal, F(ab') ₂ Fragment, Alexa Fluor488	Abcam plc, Cambridge, UK

Donkey Anti-Mouse IgG	Maus-IgG	Esel, polyklonal, Alexa Fluor488	Abcam plc, Cambridge, UK
Donkey Anti-Rabbit IgG	Kaninchen-IgG	Esel, polyklonal, Alexa Fluor405	Abcam plc, Cambridge, UK
Donkey Anti-Goat IgG	Ziegen-IgG	Esel, polyklonal, FITC	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Donkey Anti-Goat IgG	Ziegen-IgG	Esel, polyklonal, HRP konjugiert	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Goat Anti-Rabbit IgG	Kaninchen-IgG	Ziege, polyklonal, HRP konjugiert	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
mIgGκ BP	Maus-IgGκ Leichtketten	Bindungsprotein, HRP konjugiert	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg

4.1.1.6. Fertigarzneimittel

Fertigarzneimittel	Inhaltsstoffe	Inhaber, Patenthalter
Mitoxantron 10 mg/5 ml, Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung	Mitoxantron 10 mg Natriumchlorid Natriumacetat-Trihydrat Natriumsulfat Salzsäure 10 % Essigsäure 99 % Wasser für Injektionszwecke	Hexal AG, Holzkirchen

4.1.2. Hergestellte Reagenzien

4.1.2.1. Substanzlösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Cisplatin-Stammlösung (5 mM)	Cisplatin 15,0 mg DPBS ad 10,0 mL

Material und Methoden

Cisplatin-Arbeitslösung (1 mM)	Cisplatin-Stammlösung (5 mM) DPBS	0,200 mL 0,800 mL
Cisplatin-Arbeitslösung (3,2 mM)	Cisplatin-Stammlösung (5 mM) DPBS	0,631 mL 0,369 mL
FAK14 Inhibitor- Stammlösung (1 mM)	FAK 14 Inhibitor Purelab Plus®-Wasser	2,84 mg ad 10,0 mL
FAK14 Inhibitor- Arbeitslösung (10 µM)	FAK 14 Inhibitor- Stammlösung Purelab Plus®-Wasser	100 µL ad 10,0 mL
Mangan(II)chlorid-Stammlösung (100 mM)	Mangan(II)chlorid Purelab Plus®-Wasser	0,629 mg ad 50,0 mL
Mangan(II)chlorid-Arbeitslösung (10 mM)	Mangan(II)chlorid- Stammlösung (100mM) Purelab Plus®-Wasser	5,0 mL ad 50,0 mL
Mitoxantron-Stammlösung (4,5 mM)	siehe Fertigarzneimittel	
Mitoxantron-Arbeitslösung (3,2 mM)	Mitoxantron- Stammlösung (4,5 mM) DPBS	0,703 mL ad 1,0 mL
Mitoxantron-Arbeitslösung (1 mM)	Mitoxantron- Stammlösung (4,5 mM) DPBS	0,222 mL ad 1,0 mL
SCH772984-Stammlösung (10 mM)	SCH772984 DMSO	5,0 mg 851,0 µL
SCH772984-Arbeitslösung (2,5µmM)	SCH772984- Stammlösung DPBS	1,25 µL ad 5,0 mL
UO126-Stammlösung (58,6 mM)	UO126 DMSO	5,8 mg 1000,0 µL
UO126-Arbeitslösung (50 µM)	UO126-Stammlösung DPBS	4,2 µL ad 5,0 mL
666-15-Stammlösung (10 mM)	666-15 DMSO	5,0 mg 806,0 µL
666-15-Arbeitslösung (1 µM)	666-15 DPBS	0,5 µL ad 5,0 mL

4.1.2.2. Antikörperverdünnungen Westernblot

Antikörperverdünnung/-stammlösung	Zusammensetzung	
β -Aktin (1:200-1000)	Natriumazid	10 mg
	BSA	500 mg
	β -Aktin (C4)	10-50 μ L
	TBS-T	10,0 mL
APC (1:1000)	Natriumazid	10 mg
	BSA	500 mg
	APC (F3)	10 μ L
	TBS-T	10,0 mL
Axin1 (1:500)	Natriumazid	10 mg
	BSA	500 mg
	Axin1 (N1-N2)	20 μ L
	TBS-T	10,0 mL
β -catenin (1:200)	Natriumazid	10 mg
	BSA	500 mg
	β -catenin (H-102)	50 μ L
	TBS-T	10,0 mL
pCREB (1:200)	Natriumazid	10 mg
	BSA	500 mg
	pCREB (10E9)	50 μ L
	TBS-T	10,0 mL
E-Cadherin (1:200)	Natriumazid	10 mg
	BSA	500 mg
	E-Cadherin (H-108)	50 μ L
	TBS-T	10,0 mL
GAPDH (1:20000)	Natriumazid	10 mg
	BSA	500 mg
	GAPDH (GT239)	0,5 μ L
	TBS-T	10,0 mL
pGSK-3 β (1:200)	Natriumazid	10 mg
	BSA	500 mg
	pGSK3- β (Ser9)	50 μ L
	TBS-T	10,0 mL
β 1-Integrin (1:200)	Natriumazid	10 mg
	BSA	500 mg
	β 1-Integrin (P5D2)	50 μ L
	TBS-T	10,0 mL
LaminB1 (1:200)	Natriumazid	10 mg
	BSA	500 mg

Material und Methoden

	LaminB1 (H-90)	50 µL
	TBS-T	10,0 mL
p-MEK-1/2 (1:200)	Natriumazid	10 mg
	BSA	500 mg
	p-MEK-1/2 (7E10)	50 µL
	TBS-T	10,0 mL
TCF4 (1:200)	Natriumazid	10 mg
	BSA	500 mg
	TCF4 (H-125)	50 µL
	TBS-T	10,0 mL
mIgGκ BP (1:10000)	Magermilchpulver	1,000 g
	Anti-Mouse Antikörper- Streptactin aus Precision	1 µL
	Plus Protein™	0,5 µL
	WesternC™ Pack	20,0 mL
	TBS-T	
Sekundärer anti-Goat Antikörper (1:10000)	Magermilchpulver	1,000 g
	Anti-Goat Antikörper	1 µL
	Streptactin aus Precision	0,5 µL
	Plus Protein™	
	WesternC™ Pack	20,0 mL
Sekundärer anti-Rabbit Antikörper (1:10000)	Magermilchpulver	1,000 g
	Anti-Rabbit Antikörper	1 µL
	Streptactin aus Precision	
	Plus Protein™	0,5 µL
	WesternC™ Pack	20,0 mL
	TBS-T	

4.1.2.3. Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung	
Blocking-Lösung	Magermilchpulver	5,0 g
	TBS-T	ad 100,0 mL
BSA-Lösung 0,5 %	BSA	0,25 g
	Natriumazid	0,05 g
	PBS-Puffer	50,0 mL
BSA-Lösung 1 %	BSA	0,50 g
	Natriumazid	0,05 g

Material und Methoden

	PBS-Puffer	50,0 mL
BSA-Lösung 3 %	BSA	1,50 g
	Natriumazid	0,05 g
	PBS-Puffer	50,0 mL
Elektrodenpuffer	Elektrodenpuffer 10x	100,0 mL
	Aqua Millipore®	ad 1000 mL
Elektrodenpuffer 10x	Glycin	72 g
	TRIS-Base	15 g
	SDS	5 g
	Aqua Millipore®	ad 500 mL
Ethanol 10%	Ethanol 96%	10,4 mL
	PBS-Puffer	ad 100,0 mL
Glycin-Lösung (0,1 M)	Glycin	0,375 g
	PBS-Puffer	50,0 mL
Kryo-Medium	FKS	45,0 mL
	DMSO	5,0 mL
Luminol-Peroxidlösung	Clarity Western Peroxid-Reagenz	4,0 mL
	Clarity Western Luminol-Reagenz	4,0 mL
Lysepuffer	PMSF-Stammlösung (0,3 mol/L)	34 µL
	Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (100X)	500 µL
	Cell Extraction Buffer	10,0 mL
MTT-Reagenz (5 mg/mL)	MTT	50,0 mg
	PBS-Puffer	ad 10,0 mL
Paraformaldehyd-Lösung 2 %	Paraformaldehyd	1,0 g
	PBS-Puffer	50,0 mL
PMSF-Stammlösung (0,3 mol/L)	PMSF	250 mg
	DMSO	4,783 mL
Proteinstandard-Lösung (0,2 mg/mL)	BSA	2,0 mg
	Aqua Millipore®	ad 10,0 mL
Saponin-Stammlösung 1 %	Saponin	0,5 g
	PBS-Puffer	50,0 mL
Saponin-Lösung 0,01 %	Saponin-Stammlösung (1 %)	500,0 µL
		50,0 mL
	PBS-Puffer	

Material und Methoden

Selektionsmedium (pGL4.49[luc2P/TCF-LEF/Hygro] Vector)	Fötales Kälberserum F7524 Hygromycin B Gold Penicillin/Streptomycin-Lösung (10.000 I.E./mL, 10 mg/mL) L-Glutaminlösung (200 mM) RPMI-1640® Nährmedium	50,0 mL 500 µg/mL 5,0 mL 5,0 mL 500,0 mL
Selektionsmedium (Integrin β1 siRNA (h), shRNA)	Fötales Kälberserum F7524 Puromycin Penicillin/Streptomycin-Lösung (10.000 I.E./mL, 10 mg/mL) L-Glutaminlösung (200 mM) DMEM Nährmedium	50,0 mL 0,3 µg/mL 5,0 mL 5,0 mL 500,0 mL
TBS	TBS 10× Aqua Millipore®	100,0 mL ad 1000,0 mL
TBS 10x	Natriumchlorid TRIS-Base Aqua Millipore® pH-Einstellung mit 1 M Salzsäure auf 7,3	40,0 g 6,060 g ad 500,0 mL
TBS-T	TBS 10× Tween™ 20 Aqua Millipore®	100,0 mL 2,0 mL ad 1000,0 mL
Transferpuffer	Transferpuffer 10× Aqua Millipore®	100 mL ad 1000 mL
Transferpuffer 10x	Glycin TRIS-Base Aqua Millipore®	72,0 g 15,0 g ad 500,0 mL
Triton-Stammlösung 0,1 %	Triton PBS-Puffer	50,0 µL 50,0 mL
Triton-Lösung 0,001 %	Triton-Stammlösung (0,1%) PBS-Puffer	500,0 µL 50,0 mL
Vollmedium MCF-7	Fötales Kälberserum F7524 Penicillin/Streptomycin-	50,0 mL

Vollmedium MV3	Lösung	5,0 mL
	(10.000 I.E./mL,	5,0 mL
	10 mg/mL)	500,0 mL
	L-Glutaminlösung	
	(200 mM)	
	DMEM Nährmedium	
	Fötale Kälberserum	50,0 mL
	F7524	
	Penicillin/Streptomycin-	
	Lösung	5,0 mL
	(10.000 I.E./mL,	5,0 mL
	10 mg/mL)	500,0 mL
	L-Glutaminlösung	
	(200 mM)	
	RPMI-1640® Nährmedium	

4.1.3. Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
CASY® cups	Schärfe System GmbH, Reutlingen
Combitips advanced® (1,0 mL/0,5 mL/0,1 mL)	Eppendorf AG, Hamburg
CytoOne® 96-Well-Platte, TC-behandelt	Starlab GmbH, Ahrensburg
CytoOne® 24-Well-Platte, TC-behandelt	Starlab GmbH, Ahrensburg
Deckgläser Stärke No. 1, eckig	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Einmalspritzen Injekt® Solo (10 mL)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Einmalspritzen Injekt® Solo (20 mL)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Filterpapier 50/PKG, Mini T/B	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Mini-PROTEAN® TGX™ stainfree	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Gel-Pipettenspitzen MultiFlex Round	Sorenson BioScience Inc., Salt Lake City, UT, USA
Kryoröhrchen PP, mit Schraubverschluss, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Mikroplatte, 96-Well, PS, V-Boden, klar	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Nunc™ F96 MicroWell™ Polystyrolplatte, schwarz	Thermo Fisher Scientific GmbH, Langenselbold

Nunc™ F96 MicroWell™ Polystyrolplatte, weiß	Thermo Fisher Scientific GmbH, Langenselbold
Objektträger Stärke ca. 1 mm	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Pasteurpipetten, Glas	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Pipettenspitzen (1-10 µL), natur	Starlab GmbH, Ahrensburg
Pipettenspitzen (1-200 µL), gelb	Starlab GmbH, Ahrensburg
Pipettenspitzen (101-1000 µL), natur	Starlab GmbH, Ahrensburg
Pipettenspitzen (5 mL) Plastibrand®, natur	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Pipettier Reservoirs	Argos Technologies, Inc., Illinois, USA
Reagiergefäße (0,6 mL)	Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam, Niederlande
Reagiergefäße (1,5 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Reagiergefäße (2,0 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Röhrchen, 15 mL, PP, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Röhrchen, 50 mL, PP, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Roti®-PVDF, 0,45 µm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Serologische Pipetten (10 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Serologische Pipetten (25 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
TC-Platte 6 Well, Standard, F	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zellkulturflaschen, 50 mL, 25 cm², PS	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturflaschen, 250 mL, 75 cm², PS	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturflaschen, 550 mL, 175 cm², PS	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturflaschen, 650 mL, 175 cm², CELLCOAT Collagen Type I	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

4.1.4. Geräte

Gerät	Hersteller
Absaugsystem BVC 21 NT	Vacuubrand GmbH & Co. KG, Wertheim
Accu-Jet®	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Accu-Jet® pro	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim

Analysenwaage Kern 770	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Analysenwaage Mettler Toledo Classic Plus AB135-S	Mettler-Toledo GmbH, Giessen
Analysenwaage Sartorius basic BA210S	Sartorius AG, Göttingen
Analysenwaage Sartorius R160P	Sartorius AG, Göttingen
ChemiDoc™ XRS+ System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
CO ₂ -Brutschrank ICO105med	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach
CO ₂ -Inkubator MCO-170 AIC (UV)	Panasonic Healthcare Co., Kadoma, Japan
CO ₂ -Inkubator NuAire™ DH AutoFlow	NuAire Inc., Plymouth, MN, USA
Guava® easyCyte HT	Merck KGaA, Darmstadt
Laborschüttler KS-15	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Laminar-Air-Flow-Werkbank Heraeus Herasafe HSP 12	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Laminar-Air-Flow-Werkbank Holten safe 2010	Heto-Holton A/S, Allerød, DK
Lichtmikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Lichtmikroskop Wilovert 30	Helmut Hund GmbH, Wetzlar
Lichtmikroskop Wilovert Standard HF/K	Helmut Hund GmbH, Wetzlar
Magnetrührer RCT basics	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen
Magnetrührer MR 3001	Heidolph Elektro GmbH & Co. KG, Kelheim
Mehrfachdispenser HandyStep® S	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Mehrfachdispenser HandyStep® electronic	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Messkolben BLAUBRAND®, Klasse A (10 mL)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Messkolben BLAUBRAND®, Klasse A (50 mL)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Messkolben BLAUBRAND®, Klasse A (100 mL)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Messkolben BLAUBRAND®, Klasse A (250 mL)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Messkolben BLAUBRAND®, Klasse A (500 mL)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Mini-PROTEAN® Tetra Cell and Blotting Module mit PowerPac 300	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Multipette® M4	Eppendorf AG, Hamburg
Multiskan® EX	Thermo Scientific GmbH, Langenselbold
Multiwellreader FLUOstar™ OPTIMA	BMG Labtech GmbH, Offenburg
Multiwellreader POLARstar™ OPTIMA	BMG Labtech GmbH, Offenburg
PARAFILM® M	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
pH-Meter S20 SevenEasy™ pH	Mettler-Toledo GmbH, Giessen
Pinzetten, diverse	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Pipette (1-5 mL) Finnpiquette®	Thermo Fisher Scientific GmbH, Langenselbold
Pipette (10 µL) Research®	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette (100 µL) Research®	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette (1000 µL) Research®	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette (10 µL) Ranin	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Pipette (100 µL) Transferpette® S	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Pipette (200 µL) Transferpette® S-12	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Pipette (200 µL) Transferpette®-12 electronic	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Probenaufbereiter MicroCal ThermoVac	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Purelab® Plus Wasseraufbereitungsanlage	ELGA LabWater, Celle
Purelab® Flex Wasseraufbereitungsanlage	ELGA LabWater, Celle
Schüttelinkubator Unimax® 1010	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach
Spatel, diverse	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Steri-Cycle® CO ₂ -Begasungsbrutschrank	Thermo Electron GmbH, Dreieich
Thermomixer comfort (IsoTherm 1,5 mL)	Eppendorf AG, Hamburg
Trockenschrank 60°C	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Ultraschallbad Sonorex® Super RK 103 H	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin
Vakuum-Chemiepumpstand PC5	Vacuubrand GmbH & Co. KG, Wertheim
Vortex-Genie 2	Scientific industries, New York, USA
Zellzähler CASY® 1 Model TT	Schärfe System GmbH, Reutlingen
Zentrifuge Allegra™ 25R	Beckmann-Coulter GmbH, Krefeld
Zentrifuge Avanti J-25	Beckmann-Coulter GmbH, Krefeld
Zentrifuge Micro 200 R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG,

	Tuttlingen
Zentrifuge Mini Spin	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Universal 32 R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Zentrifuge Universal 320 R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen

4.1.5. Software

Bezeichnung/Version	Urheber
2010 Microsoft:	© Microsoft Corporation 2010
<ul style="list-style-type: none"> • Microsoft Office Excel v14.0.7190.5000 • Microsoft Office Word v14.0.7190.5000 • Microsoft Visio v14.0.7188.5002 	
Ascent Software™ v2.6	© Thermo Labsystems Oy 1996-2002
ChemSketch Ultra v14.01	© ACD/Labs 2012
FlowJo X 10.0.7r2	© Tree Star, Inc
Image Lab v6.0	© Bio-Rad Laboratories 2010
Image J 1.51 j8	© Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA
InCyte™	© Merck KGaA, Darmstadt
Optima v.2.20R2	© BMG Laptech
Prism 5 for Windows v5.00	© GraphPad Software Inc. 1992-2007
ZEN 2012 v.1.1.2.0	© Carl Zeiss
Zotero 5.0.44	© Roy Rosenzweig Center for History and New Media

4.2. Zellkultur

Alle im Folgenden beschriebenen Arbeiten mit lebender Zellkultur wurden unter einer Laminar Air Flow-Werkbank durchgeführt, um eine Kontamination zu vermeiden. Sowohl die *Bench*, als auch alle unter die *Bench* verwendeten Arbeitsmaterialien wurden vor und nach Gebrauch mit 70 % (V/V) Isopropanol gereinigt. Grundsätzlich waren alle Verbrauchsmaterialien entweder ab Werk steril oder wurden zuvor autoklaviert.

4.2.1. Zelllinien

In dieser Arbeit wurden zwei Zelllinien verwendet: die humane Melanomzelllinie MV3 und die humane Brustkrebszelllinie MCF-7, sowie genetisch modifizierte Klone dieser beiden Zelllinien.

4.2.1.1. MV3

MV3-Zellen entstammen ursprünglich den metastasierenden Melanomzellen eines 76-jährigen Patienten und wurden nach der Isolierung in Nacktmäusen selektiert (317). Dabei bleiben histologische und immunhistologische Charakteristika der humanen Melanomzelle erhalten und lassen sich in *in vitro* Experimenten untersuchen. Die Zellen wurden in modifiziertem RPMI-1640[®] Nährmedium (im Weiteren als Vollmedium bezeichnet) bei 37 °C und unter 5 % CO₂- Atmosphäre kultiviert.

4.2.1.2. MCF-7

MCF-7-Zellen wurden einer 69-jährigen Patientin entnommen, die an einem Adenokarzinom erkrankte. Die Endothelzellen des Brustdrüsengewebes wurden einer Metastase aus der Pleurahöhle entnommen (318). Die MCF-7-Zelllinie behält verschiedene Charakteristika des differenzierten Brustdrüsenepithels, bspw. die Fähigkeit Estradiol über Estrogenrezeptoren zu prozessieren (319). Des Weiteren exprimieren sie das WNT7B Onkogen (320). Die Zellen wurden in modifiziertem DMEM Nährmedium (im Weiteren als Vollmedium bezeichnet) bei 37 °C und unter 5 % CO₂- Atmosphäre kultiviert.

4.2.1.3. MV3 und MCF-7 *knock-down* Klone und MV3 und MCF-7 *scrambled* Kontrollklone

Alle vier Zelllinien (MV3-sc, MV3-kd, MCF-7-sc, MCF-7-kd) wurden analog ihren Wildtyp- (WT-)Gegenstücken kultiviert. Den einzigen Unterschied stellte der Zusatz von Puromycin als Selektionsreagenz dar. Zu Beginn lag die Puromycin Konzentration bei 0,3 µg/mL, wurde jedoch im Laufe der Kultivierung auf 0,5 µg/mL erhöht (siehe 4.7.2). Die Erzeugung und die Eigenschaften der transduzierten Zellen werden im Abschnitt 4.7 besprochen.

4.2.2. Lagerung

Zellmedien wurden zur Verlängerung der Haltbarkeit im Kühlschrank bei 2-8 °C gelagert und vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt im Inkubator kultiviert. Die Medienzusätze Penicillin/Streptomycin, Fötale Kälberserum (FKS), L-Glutamin, Puromycin und Hygromycin wurden im Eisfach bei -20 °C gelagert.

4.2.3. Kultivierung

Da sowohl MV3 als auch MCF-7 (und damit auch ihre jeweiligen *knock-down* und *scrambled* Klone) adhärente Zellen sind, erreichen sie mit fortschreitender Inkubationsdauer irgendwann den Zustand vollständiger Konfluenz. Da bei vollständiger Konfluenz die Gefahr von Selektion und eines Absterbens der Kultur besteht, wurden die Zellen regelmäßig vor Erreichen der Konfluenz subkultiviert. Dabei wurden die Zellen zuerst mit DPBS gewaschen und anschließend unter Verwendung von 0,025 %iger EDTA-Lösung abgelöst. Die vollständige Ablösung der Zellen dauerte ungefähr fünf Minuten. Die Zellen wurden für diesen Zeitraum im Inkubator gelagert. Anschließend wurden die gelösten Zellen mit Vollmedium vom Flaschenboden abgespült und die vereinigte Flüssigkeit aus EDTA und Vollmedium in einem Röhrchen gesammelt. Die Zellen wurden nun bei 4 °C und 310 g über 5 min abzentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde nach Entnahme des Überstandes auf eine gewünschte Konzentration mit Vollmedium resuspendiert und für die weitere Kultivierung ausgesät. Jede Subkultivierung wurde durch Angabe der Passage kenntlich gemacht, um eine Aussage

über das Alter der verwendeten Zellen treffen zu können. Die Zellkultur unterliegt von Natur aus Schwankungen (Zellzyklus etc.) und eine übermäßige Kultivierung führt zur genetischen Diversifikation der Zelllinie. Um dies zu verhindern wird die Kenntlichmachung der Passage als Kontrollinstrument genutzt.

4.2.4. Kryokonservierung

Um Zellen auch außerhalb von Kultivierungsphasen verfügbar zu halten, sind von allen in dieser Arbeit beschriebenen Zelllinien Backups vorhanden. Diese Backups enthalten alternierende Zellzahlen, abhängig vom späteren Verwendungszweck und der Zelldichte bei Erstellung des Backups. Dafür wurden die Zellen, wie unter 4.2.3 beschrieben, abgelöst, in Kryo-Medium resuspendiert und in Kryo-Röhrchen aliquotiert. Diese wurden zunächst für wenige Stunden bei -20 °C und anschließend bei -80 °C eingefroren. Nach wenigen Tagen im Gefrierschrank wurden die Zellen zur dauerhaften Lagerung in den Stickstofftank überführt. Durch das langsame Einfrieren und das im Gefriermedium enthaltene Dimethylsulfoxid (DMSO) wird ein Auskristallisieren von Wasser in den Zellen vermieden. Somit lassen sich Zellen über mehrere Jahre konservieren.

Bei Bedarf kann ein Backup jederzeit erneut in Kultur genommen werden. Dafür wurden die Backups dem Stickstofftank entnommen und in warmen Vollmedium zügig resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert um toxisches DMSO zu entfernen und in die gewünschten Zellkulturbehältnisse erneut ausgesät.

4.2.5. Zellzahlbestimmung

Um die genaue Zellzahl zu bestimmen, wurden die Zellen nach dem Ablösen und Zentrifugieren in Medium resuspendiert und anschließend 20 µL in ein, mit 10 mL CASY[®]ton gefülltes, CASY[®]cup überführt (Verdünnung 1:500). Diese Suspension kann nun am CASY[®] bestimmt werden (321). Dafür fungiert das Gerät als Coulter-Zähler. Indem es die Zellen über eine Kapillare erst vereinzelt und anschließend innerhalb eines von ihm erzeugten elektrischen Feldes eine Widerstandsmessung vornimmt, sind Aussagen über die Zellzahl möglich. Da jede Zelle abhängig von ihrer Größe den Widerstand spezifisch verändert, kann das Gerät neben der absoluten Zellzahl auch eine Größenverteilung der Zellpopulation darstellen. Dabei sind besonders kleine Partikel das Resultat von Zellstoffwechselprozessen, Verunreinigungen oder toten Zellen, die vom

Gerät automatisch aus der Berücksichtigung der Berechnung der vitalen Zellen genommen werden. Anhand der vom CASY definierten Zahl vitaler Zellen kann auf die Gesamtzahl der sich in Suspension befindlichen Zellen geschlossen und die gewünschte Zellzahl eingestellt werden.

4.2.6. Mykoplasmentest

Um eine Kontamination der Zellen mit Mykoplasmen auszuschließen, wurden die Zellen durch Anfärbung mit DAPI untersucht. Dafür wurden 100.000 Zellen in 1 mL Medium suspendiert und anschließend in einer 24 well Platte anwachsen gelassen. Anschließend wurde 1 mL einer 0,3 $\mu\text{mol/L}$ DAPI-Lösung zugesetzt und nach 10 min am Fluoreszenzmikroskop bei einer Anregungswellenlänge von 405 nm untersucht. DAPI bindet dabei an die DNS der untersuchten Zellen und an eventuell enthaltenden Mykoplasmen. Die Differenzierung erfolgte über den Größenunterschied zwischen Zellen und Mykoplasmen.

4.3. Kollagen Beschichtung

4.3.1. Allgemein

Um *in vitro* ein physiologisch möglichst realitätsgetreues Umgebungsmilieu zu simulieren, bildet man die, die Zelle umgebende Extrazellulär Matrix (ECM) mit Hilfe von Substraten nach. Darunter fallen u.a. die Polypeptide Kollagen (auch Collagen) und Fibronectin. Neben industriell bereits vorgefertigten Produkten (Platten, Flaschen etc.) ist es möglich, mit Hilfe einer Kollagen-Stammlösung die verwendeten Platten und Zellkulturflaschen vor Gebrauch händisch (individuell) zu beschichten. Für die manuelle Beschichtung wurde wie folgt vorgegangen.

4.3.2. Praktische Durchführung

Für die Beschichtung einer 96-Well-Platte wurde eine gewünschte Schichtdicke von $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ angenommen. Für eine exemplarische Rechnung wird hier eine Kollagen-Stammlösung mit 2 mg/mL verwendet. Im ersten Schritt wird aus der gewünschten Schichtdicke die benötigte Kollagen Konzentration (Kollagen/mL) ermittelt (Formel 1).

Die Fläche eines Wells einer 96-Well Platte wird hier exemplarisch mit $0,30\text{ cm}^2$ angegeben.

$$\frac{0,30\text{ cm}^2 \times 10\text{ }\mu\text{g/cm}^2}{25\text{ }\mu\text{L}} = 0,12\text{ }\mu\text{g/mL}$$

Formel 1: Berechnung der Kollagen Konzentration.

Im nächsten Schritt wird die Menge Kollagen für das benötigte Volumen an Arbeitslösung berechnet. Exemplarisch sollen 3 mL Arbeitslösung erstellt werden (Formel 2).

$$3\text{ mL} \times 0,12\text{ }\mu\text{g/mL} = 0,36\text{ mg}$$

Formel 2: Berechnung der Kollagen Menge für eine Arbeitslösung mit 3 mL Volumen.

Abschließend wird das benötigte Volumen Stammlösung bestimmt (Formel 3).

$$\frac{0,36\text{ mg}}{2\text{ mg/mL}} = 0,18\text{ mL}$$

Formel 3: Berechnung des Verbrauchs an Stammlösung.

Den 0,18 mL Stammlösung werden in diesem Fall 2,82 mL DPBS zugesetzt und 25 μL pro Well pipettiert. Die Platten wurden abschließend unter der Laminar-Air-Flow-Werkbank getrocknet und jedes Well mit DPBS gewaschen.

4.4. Proteinanalytik

4.4.1. Lysat Präparation

4.4.1.1. Allgemein

Um Veränderungen des Genoms, Proteoms, Transkriptoms etc. einer Zelle zu untersuchen, ist es häufig nötig die Zelle aufzuschließen, um sie voll umfänglich untersuchen zu können. Für diese Arbeit ist vorrangig das Proteom von Bedeutung, da Proteine als finaler Schritt der zellulären Signalweiterleitung von der genetischen

Kodierung zur zellulären Reaktion dienen. Um diese Veränderungen sichtbar zu machen, wird z.B. auf den sogenannten Westernblot zurückgegriffen, mit dessen Hilfe Proteine quantitativ und qualitativ bestimmt werden können. Dazu wurden die Zellen zunächst in einem mehrstufigen Verfahren lysiert. Die Lyse ist durch mechanische Methoden, wie z.B. die Ultraschall-Behandlung, oder mittels chemischer Aufschlüsse unter Verwendung von Detergenzien möglich. Die Lyse unter Verwendung von Detergenzien schon das Zelllysate, da lediglich eine Separation der Protein-Protein, Lipid-Lipid und Protein-Lipid Interaktionen stattfindet. Bei mechanischen Prozessen besteht ein höheres Risiko für eine Denaturierung der Proteine bspw. aufgrund von thermischen Fluktuationen innerhalb der Probe.

Des Weiteren ist die Trennung des Lysates in zwei Endfraktionen während der Herstellung möglich. Diese setzen sich einerseits aus der zytosolischen Fraktion und andererseits aus der nukleären Fraktion zusammen. Dabei wird die Tatsache ausgenutzt, dass der Zellkern über eine eigene Zellmembran verfügt. Unter Verwendung eines hypotonen Puffers wird die Zelle zum „Platzen“ gebracht, um anschließend durch Zentrifugation die Nuklei als Pellet abzuscheiden und separat mit Detergenzien zu lysieren.

4.4.1.2. Praktische Durchführung

Nach einer beliebigen Behandlung z.B. der Inkubation der Zellen auf Kollagen für einen Zeitraum von 72 h wurden diese mit EDTA von der Wandung abgelöst und anschließend, analog zum Prozess des Zellen-Splittens, pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in kaltem DPBS resuspendiert und 20 µL für die Zellzählung entnommen. Nach erneutem Pelletieren konnten die Zellen in Zelllysepuffer resuspendiert werden. Die Menge des verwendeten Zelllysepuffers richtete sich nach der zuvor bestimmten Zellzahl und der gewünschten Proteinendkonzentration (üblicherweise zwischen 100 µL und 1000 µL). Zuvor wurde der verwendete Lysepuffer, wie unter 4.1.2.3 beschrieben, frisch hergestellt. Anschließend wurde das Lysat für 30 min bei ca. 0 °C auf einem Schüttler inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden alle nicht solvatisierten Zellbestandteile bei 20.635 g für 10 min abzentrifugiert und der erhaltende Überstand zu je 100 µL aliquotiert. Eine Lagerung der Lysate bei -80 °C für einen maximalen Zeitraum von sechs Monaten ist möglich.

Isolation der nukleären Fraktion

Die Herstellung und Isolation der nukleären bzw. der zytosolischen Fraktion in einem Ansatz wurde durch den Einsatz des *Nuclear/Cytosol Extraction Kit* realisiert. Alle Schritte wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt und die erhaltenden Lysate in Aliquots von 10 – 100 µL (abhängig von Fraktion und Zelldichte) bei -80 °C gelagert. Vor der Verwendung wurde der enthaltende Zellysepuffer A und der nukleäre Zellysepuffer mit jeweils 1 µL DTT und 1 µL PIC pro mL versetzt.

Lysate Proteome Profiler

Die Herstellung und Lagerung der für die Durchführung des humanen *Proteome Profiler Arrays* verwendeten Lysate erfolgte nach den Angaben des Herstellers (*sample collection and storage*). Um Auftau-/Einfrier- Zyklen zu vermeiden, wurden die Lysate in Aliquots a 100 µL gelagert.

4.4.1.3. Quantifizierung des Proteingehalts

Die Gesamtproteinmenge der unter 4.4.1.2 erhaltenden Lysate konnte mittels BCA-Assay bestimmt werden. Diesem Assay liegt eine Biuret-Reaktion zugrunde, bei der in alkalischer Lösung Moleküle mit zwei Peptidbindungen zweiwertige Kupferionen komplexieren. In Anlehnung an dieses Prinzip werden beim BCA-Assay in einer Kupfersulfat Lösung enthaltende Kupfer(II)ionen durch die reduktiven Gruppen der Aminosäuren des Gesamtproteins zu Kupfer(I)ionen reduziert. Es konnte gezeigt werden, dass Cystein, Cystin, Tryptophan, Tyrosin und die Peptidbindung selbst als Reduktionsmittel fungieren. Anschließend komplexiert die Bicinchoninsäure (BCA) die gebildeten Kupfer(I)ionen und bildet eine violett-blaue Färbung aus die im alkalischen Milieu stabil bleibt (Abbildung 14) (322).

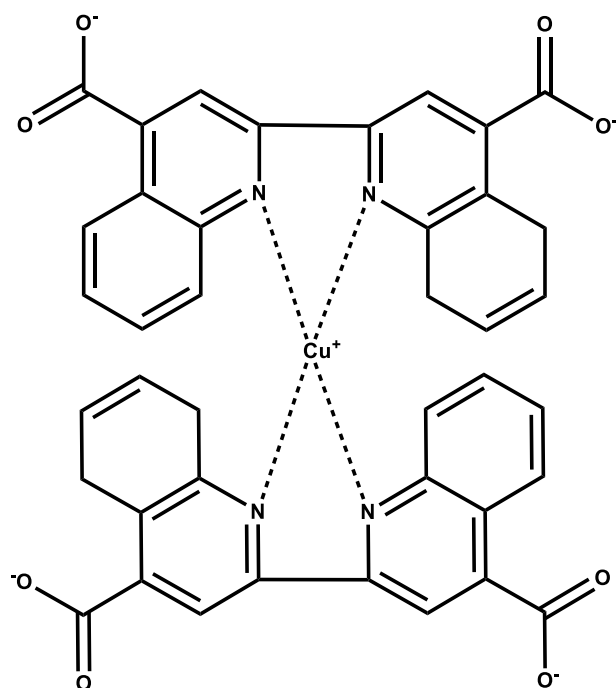


Abbildung 14: Kupfer(I)-Bicinchoninsäure-Komplex

Um innerhalb der Grenzen des Lambert-Beer'schen Gesetzes zu arbeiten, wurden die Ansätze 1:20, 1:50 und 1:100 aus einer Startverdünnung von 1:10 des Ursprungs-Lysates hergestellt. Diese drei Verdünnungen wurden nun in eine 96-Well-Platte ausplattiert. Zusätzlich wurde eine Reihe an Referenzen (Ref) für eine Kalibriergerade von 0 - 400 $\mu\text{g/mL}$ und drei Qualitätskontrollen (QC) (150 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$ und 350 $\mu\text{g/mL}$) in die Platte pipettiert (Abbildung 15). Der Korrelationskoeffizient der Kalibriergeraden sollte bei 0,99 liegen und die QCs nicht stärker abweichen als $\pm 5 \%$.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Ref 0		QC 250		Lysat 3 Verdünnung 1:20							
B	Ref 50		QC 350		Lysat 3 Verdünnung 1:50							
C	Ref 75		Lysat 1 Verdünnung 1:20		Lysat 3 Verdünnung 1:100							
D	Ref 100		Lysat 1 Verdünnung 1:50									
E	Ref 200		Lysat 1 Verdünnung 1:100									
F	Ref 300		Lysat 2 Verdünnung 1:20									
G	Ref 400		Lysat 2 Verdünnung 1:50									
H	QC 150		Lysat 2 Verdünnung 1:100									

Abbildung 15: Pipettierschema einer BCA-Proteinbestimmung. Exemplarisch sind drei Lysate (Lysat 1/2/3) bestimmt worden. Des Weiteren sind die Referenzen (Ref) für die Kalibriergerade und die Qualitätskontrollen (QC) aufgetragen.

Die Kupfersulfat-Lösung und das BCA-Reagenz wurden im Verhältnis 1:50 gemischt und 200 µL/Well dieser Mischung, auf die Proben gegeben. Die Inkubation erfolgte bei 60 °C über eine Stunde. Anschließend wurden die Platten auf RT abgekühlt und bei 570 nm vermessen (323).

4.4.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

4.4.2.1. Allgemein

Gelelektrophoretische Verfahren ermöglichen es mit Hilfe elektrischen Stroms Proteine über ihre Ladungen und ihre alternierenden Größen innerhalb eines polymerisierten SDS-Gels aufzutrennen. Der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese liegt dabei das Prinzip der Disk-Elektrophorese zugrunde. Disk ist die Kurzform für diskontinuierlich und bezeichnet die Trennung des Gels in einen weitporigen Sammelgel- und einen engporigen Trenngel- Bereich. Während die Probe im Sammelgel aufkonzentriert wird, kann der sogenannte Proteinstapel im Trenngel spezifisch aufgetrennt werden. Wichtig dafür ist die Verwendung eines Tris-Chlorid/Tris-Glycin-Systems. Innerhalb des Sammelgels liegt

der pH-Wert nahe dem isoelektrischen Punkt des Glycins im Elektrophoresepuffer. Da es folglich als Zwitterion vorliegt und somit elektrisch neutral ist, spricht man von einer geringen elektrophoretischen Mobilität, dem sogenannten „Folge-Ion“. Im Gegensatz dazu besitzen die im Puffer enthaltenden Chlorid-Ionen eine hohe elektrophoretische Mobilität. Sie werden als „Leit-Ion“ bezeichnet. Nach dem Anlegen einer elektrischen Spannung wandern alle Ionen innerhalb des Sammelgels mit gleichbleibender Geschwindigkeit. Dieser Vorgang wird auch als Isotachophorese bezeichnet. Da die Feldstärke des elektrischen Feldes zwischen dem „Folge-Ion“ (sehr hohe Feldstärke) und dem „Leit-Ion“ (sehr niedrige Feldstärke) stark variiert, bildet sich zwischen diesen, abhängig von der Mobilität der Proteine, ein Proteinstapel. Am Übergang zwischen Sammel- und Trenngel kommt es nun zur Aufkonzentrierung der Proteine, da durch die Engporigkeit des Gels der Probe ein erhöhter Widerstand entgegengesetzt wird. Das niedermolekulare Glycin ist diesem Vorgang nicht unterworfen und überholt die Proteine, die anschließend in das Trenngel gelangen. Dort angekommen obliegt ihre Mobilität stark ihrer Molekülgröße. An dieser Stelle ist abschließend zu erwähnen, dass innerhalb des *sodium dodecyl sulfate* (SDS) die Eigenladung der Proteine nahezu vollständig durch das SDS abgesättigt wird. Die Eigenladung der Proteine spielt somit für die Trennung keine Rolle mehr. Alle Proteine sind in eine Art negativer Mizelle eingeschlossen, die sich aufgrund ihrer Größe innerhalb des Gels auftrennen. Je nach Zielgröße des targetierten Proteins ist es zusätzlich möglich die Porenweite des Trenngels bei der Polymerisierung des Acrylamid variabel zu gestalten. Üblich sind Gele im Bereich von 7,5 - 12 %.

Damit die Proteine der Probe sauber aufgetrennt werden, ist es üblich einen Laemmli-Puffer zu verwenden, der die Proteine der Probe reduziert. Dieser enthält β -Mercaptoethanol, welches die Schwefelbrücken zwischen den Cysteinen reduktiv spaltet. In seltenen Fällen kann es erforderlich sein auf diese reduzierenden Eigenschaften zu verzichten, um die Quartärstruktur des Proteins zu erhalten und dem spezifischen Antikörper somit weiterhin zugänglich zu machen.

4.4.2.2. Praktische Durchführung

Die Proteine wurden abhängig vom Polymerisationsgrad des Gels für einen Zeitraum von 40-60 min bei 200 V elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die *precast*

Gele aufgeknackt, die Gele in Transferpuffer gelagert und eine *stainfree* Detektion (Einstellung: *Good sensitivity* 2,5 min am ChemiDoc™ XRS+ System) vorgenommen. Dabei verbindet sich eine durch den Hersteller nicht näher klassifizierte Trihalo-Komponente unter UV-Bestrahlung mit den Tryptophanen der in der Probe enthaltenen Proteine und ermöglicht somit eine Fluoreszenzdetektion. Als Ergebnis erhält man eine Gesamtaufnahme aller Proteine, die als ‘In Prozess Kontrolle’ diente und für die Normalisierung der Proben verwendet wurde. Anschließend erfolgte der Westernblot.

4.4.3. Westernblot

4.4.3.1. Allgemein und praktische Durchführung

Der Westernblot stellt eine gängige Methode der Proteindetektion dar. Dabei wird das aus der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese erhaltene Gel auf einer Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran aufgebracht und die Proben mittels einer elektrischen Spannung aus dem Gel auf der Membran fixiert. Vor der Übertragung muss die PVDF-Membran aufgrund ihrer stark hydrophoben Eigenschaften mit Methanol für 20 s inkubiert und aktiviert werden. Die Proteine sind nach der Übertragung der Detektion mit Hilfe von Antikörpern zugänglich, da dies im 3D-Format der Gele nicht möglich ist. Das Blot Sandwich, von außen nach innen bestehend aus zwei Schwämmen, zwei Filterpapieren, der Membran und dem Gel, wurde bei 100 V für 1 h geblotted und die Proben aus dem Gel auf die Membran transferiert. Anschließend wurde die Membran entnommen und für 1 h mit 50 mL Blocking Lösung versetzt, um unspezifische Bindungsstellen auf der Oberfläche der Membran abzusättigen. Es folgt eine einstündige Inkubation mit 10 mL primärer Antikörper Lösung (die Verdünnung erfolgte gemäß dem zu untersuchenden Epitop). Zwischen den Inkubationen wurde die Membran stets dreimal mit 20 mL *Tris-buffered saline with tween20* (TBS-T) gewaschen. Im nächsten Schritt wurde die Membran für eine Stunde mit 10 mL sekundärer Antikörper-Lösung inkubiert. Der sekundäre Antikörper bindet den primären Antikörper und ermöglicht eine Detektion der Probe mittels der an den sekundären Antikörper gekoppelten Meerrettichperoxidase (HRP). Vor der entsprechenden Detektion wurden überschüssige Antikörper in einem erneuten Waschschrift entfernt. Zur Detektion wurde die Membran für fünf Minuten mit einem Luminol-Peroxidreagenz inkubiert und anschließend am ChemiDoc™ XRS+ System ausgewertet. Dabei wurde die ablaufende Chemilumineszenz Reaktion vom Gerät

detektiert, bei der Luminol durch das enthaltende Peroxid oxidiert wird. Die HRP dient dabei als Katalysator für die Peroxid-Reduktion. Es entsteht ein 3-Aminophthalat-Dianion als Intermediat. Dieses Intermediat geht von einem angeregten Singulett-Zustand (S_1) in den Grundzustand (S_0) über. Beim Fallen der Elektronen von einem Energieniveau auf das andere wird ein Photon emittiert (324).

4.4.3.2. Auswertung

Die erhaltenden Westernblots werden in dieser Arbeit exemplarisch gezeigt, zusammen mit einem *housekeeping* Protein. Verwendet wurden die zytosolischen *housekeeping* Proteine GAPDH und β -Actin sowie Lamin B1 als nukleäres *housekeeping* Protein. Pixeldichtenanalysen wurden aus Westernblots mindestens dreier Messungen erstellt, dabei erfolgt die Normalisierung auf das Gesamtprotein (*stainfree* Detektion) (325). Anschließend wurden die Verhältnisse relativ zu einer im Graphen gekennzeichneten Kontrolle aufgetragen (+SD). Geprüft auf statistische Signifikanz wurde mittels 1way ANOVA mit anschließendem Tukey Post-hoc Test. Das Signifikanzniveau wird mittels Asteriskus dargestellt wie folgt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.4.4. Proteome Profiler Array

4.4.4.1. Allgemein

Mithilfe des *Proteome Profiler™ Human Phospho-Kinase Array Kit* lassen sich 43 verschiedene Kinasen des humanen Proteomes in ihrer phosphorylierten Konfiguration bestimmen. Die Bestimmung erfolgt simultan aus zuvor erstellten Lysaten. Es handelt sich um einen Dot-Blot, bei dem die Antikörper in Duplikaten auf zwei Nitrocellulosemembranen vorfixiert sind. Der Array wird nach der Beschickung mit Proben gewaschen, mit einem Cocktail biotinylierter Detektionsantikörper inkubiert und mit Streptavidin-HRP und einem Chemilumineszenz-Reagenz detektiert.

Im Vorfeld wurden Inkubationsexperimente vorgenommen und die entstandenen Lysate mittels BCA-Assay (4.4.1.3) quantifiziert. Tabelle 1 gibt Auskunft über die Inkubationsbedingungen im Vorfeld der Lysat-Anfertigung.

Tabelle 1: Inkubationsbedingungen der Lysatpräparationen für den Proteome Profiler™ Human Phospho-Kinase Array.

Bezeichnung	Beschreibung
WT	Unbehandelte MCF-7-Zellen
+ Kollagen	MCF-7 für 72 h auf Kollagen Typ I inkubiert.
+ Kollagen + MX	MCF-7 für 72 h auf Kollagen Typ I inkubiert und mit MX (IC ₅₀) versetzt.
MCF-7-β ₁ kd + Kollagen + MX	MCF-7-β ₁ -kd für 72 h auf Kollagen Typ I inkubiert und mit MX (IC ₅₀) versetzt.

4.4.4.2. Praktische Durchführung und Auswertung

Der Proteome Profiler Array wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Ergebnis erhielt man einen *Dot-Blot*, der mittels Pixel-Analyse ausgewertet wurde. Um jeden auswertungsrelevanten *Dot* wurde eine runde Fläche mit 2.3 mm² Umfang gelegt. Somit wurden alle Pixel jedes *Dots* erfasst. Durch die Angabe von sogenannten *PBS-Dots* auf der Membran konnten im Anschluss alle Messwerte vom Hintergrundrauschen bereinigt werden, da dies der Intensität dieser Negativkontrolle entspricht. Zusätzlich befanden sich auf den Membranen *Referenz-Dots*, die als Orientierungspunkte, als Überprüfung der allgemeinen Funktionalität des Assays und als Normalisierungswert dienten (Positivkontrolle siehe auch Abbildung 16). Die Intensität der Mittelwerte der *Referenz-Dots* für eine der vier Testgruppen (hier die unbehandelte MCF-7-Zellpopulation) wurde willkürlich als Wert 1 festgelegt und die Mittelwerte der Referenzen der anderen Membranen auf diesen bezogen. Waren die *Referenz-Dots* der zweiten Membran (hier Kollagen) z.B. doppelt so hoch, ergab sich ein Faktor von 0,5. Mit diesem wurden die Werte aller Proteine auf der zweiten Membran normalisiert. Um eine Vergleichbarkeit zwischen den Membranen zu gewährleisten wurden alle Membranen nach der gleichen Entwicklungszeit ausgewertet.

Die Membranen enthalten Duplikate, aus denen nach Subtraktion des Hintergrundrauschens (*PBS-Dot*) der Mittelwert und die Standardabweichung gebildet wurden. Die so entstandenen Werte wurden graphisch gegeneinander aufgetragen. Eine statistische Auswertung der Daten entfiel.

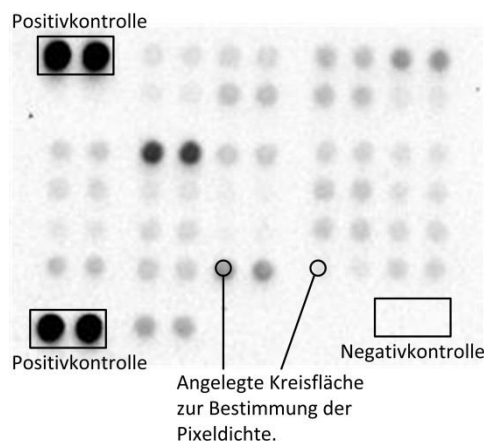


Abbildung 16: Skizze des Proteome Profiler Array. Eingezeichnet sind die Referenz-Dots als Positivkontrolle, die PBS Negativkontrolle und Beispielwerte umrandet mit einer $2,3 \text{ mm}^2$ Kreisfläche.

4.4.5. Durchflusszytometrie

4.4.5.1. Allgemein

Die moderne Durchflusszytometrie ermöglicht es mit geringem Aufwand Zellpopulationen bezüglich ihrer Größe und Oberflächenbeschaffenheit zu charakterisieren. Zusätzlich können durch eine vorhergehende Antikörper-basierte Antigen-Markierung Oberflächenstrukturen und mit spezieller Zellaufarbeitung auch interne Strukturen der Zelle einer Quantifizierung zugänglich gemacht werden. Dabei nutzt das Durchflusszytometer einen Laser, der die Probe mit monochromatischem Licht bestrahlt. Zuvor werden die Zellen über eine Kapillare vereinzelt. Die Apparatur detektiert beim Durchtritt des Laserfokus sowohl das Vorwärtsstreulicht (FSC) als auch das Seitwärtsstreulicht (SSC), das in einem Winkel von 90° zur Probe abgelenkt wird. Der FSC korreliert dabei mit der Größe der Zelle, während der SSC die Granularität beschreibt. Beide Parameter werden üblicherweise gegeneinander in einem Dot-Plot Diagramm linear oder logarithmisch dargestellt. Ebenfalls im 90° Winkel wird die Fluoreszenz der zuvor markierten Zellen gemessen. Diese wird erst über Farbteilerspiegel abgelenkt und dann mittels optischer Bandpassfilter in die unterschiedlichen Wellenlängen separiert, um die Detektion dem Emissionsspektrum des verwendeten

Fluorophors anzupassen. Anschließend werden die Signale mittels eines Photomultipliers verstärkt und in elektrische Signale umgewandelt. Regt man beispielsweise mit einem blau/grünen Laser bei 488 nm die Probe an, so können über die Filter (FL) Licht verschiedener Wellenlängen (z.B. FL1 grün, FL2 orange usw.) detektiert werden.

Das so detektierte Licht bzw. die Fluoreszenz wird in einem Histogramm dargestellt. Üblicherweise wird die Verschiebung der Fluoreszenzmaxima der Probe und einer entsprechenden Kontrolle ausgewertet. Auch andere Ansätze sind für die Auswertung denkbar, z.B. die Detektion von Propidiumiodid, das abhängig von seiner Fähigkeit die DNS zu binden, eine Verschiebung des Emissionsspektrums induziert (590 nm zu 617 nm).

Um die erhaltenen Daten sinnvoll beurteilen zu können ist es unabdingbar eine Reihe weiterer Voreinstellungen, abhängig vom experimentalen Setting, zu treffen, die im Folgenden näher erläutert werden sollen. Um Hintergrundrauschen möglichst effektiv auszuschließen, definiert man im Vorfeld der Messung einen Schwellenwert („*threshold*“), ab dem ein bestimmter Parameter gemessen wird. Beispielsweise bestimmt der Schwellenwert ab welcher Größe im FSC eine Zelle in der Messung aufgenommen wird. Somit lassen sich Artefakte der Messung bereits im Vorfeld effektiv ausschließen. Zusätzlich werden Parameter wie die Messzeit, Laserintensität und die Zellzahl pro Messung festgesetzt.

Werden innerhalb einer Messung mehrere Fluorophore verwendet, kann eine Kompensierung von Vorteil sein. Unter Kompensierung versteht man das Definieren eines Bereiches, in dem das emittierte Licht eines Fluorophors in einen anderen Kanal (Filter) strahlt, als es für seine Emission vorgesehen ist. Anschließend werden diese Bereiche, in denen es zu einer Überschneidung kommen würde, mit einem zweiten Fluorophor (im Beispiel einem blauen Fluorophor) für die Darstellung der Messung ausgeschlossen. Eine Überlappung würde die Messergebnisse anderer Fluorophore beeinflussen. Je näher die Emissionsspektren der verwendeten Fluorophore beieinander liegen, desto wahrscheinlicher ist eine Überschneidung.

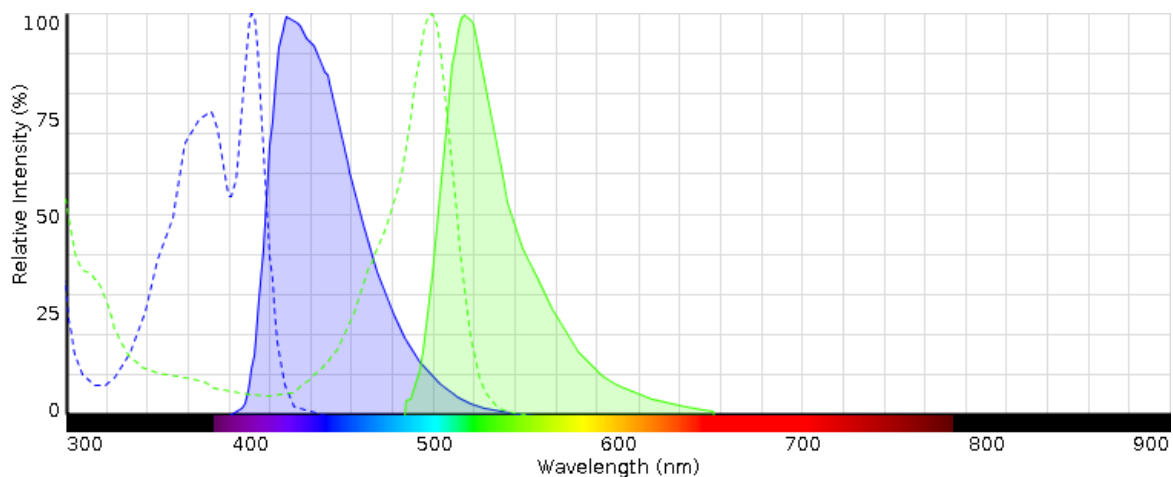


Abbildung 17: Absorptions- (gestrichelte Linien) und Emissionsspektren (durchgezogene Linien) von AlexaFluor405 (blau) und Fluoresceinisothiocyanat (grün), mit geringfügiger Überschneidung der Emissionsbereiche im Bereich zwischen 484 nm bis 551 nm. Die Graphik entstammt dem „Fluorescence SpectraViewer“ von ThermoFisher (326).

Bei den in Abbildung 17 gezeigten Fluorophoren ist eine solche Überschneidung abhängig von der Wellenlänge des verwendeten Lasers möglich und kann die Notwendigkeit für Kompensation bedeuten.

Abschließend können die erhaltenden Messwerte mit Hilfe von *Regionen* und *Gates* weiter aufgeschlüsselt werden. Mittels eines *Gates* lässt sich eine Zellpopulation auf einen bestimmten Bereich eingrenzen. Dadurch ist es möglich nur für diesen Bereich Parameter wie die Fluoreszenz zu betrachten. *Regionen* hingegen können genutzt werden, um bestimmte Bereiche des Fluoreszenzhistogramms zu isolieren und zu beurteilen. So ist es z.B. möglich für das oben bereits besprochene Propidiumiodid eine jeweilige *Region* für die beiden Emissionsmaxima zu definieren und sich somit die Zellzahl pro *Region* anzeigen zu lassen. In diesem konkreten Fall können also tote und lebendige Zellen anhand der Menge des, an die DNS gebundenem Propidiumiodid voneinander getrennt werden (327).

4.4.5.2. Durchflusszytometrie extrazellulärer Strukturen

Für die durchflusszytometrische Vermessung extrazellulärer Strukturen wurde eine modifizierte Variante des intrazellulären Protokolls verwendet. Dabei werden die relevanten Zellen mit PBS gewaschen und anschließend, wie unter 4.2.3 beschrieben, mit EDTA abgelöst. Die Zellen wurden zentrifugiert, anschließend in 2 mL Waschpuffer

(BSA-Lösung 0,5 %) resuspendiert und bei 310 g für 5 min erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wird im Folgenden als Waschschrift bezeichnet. Nach dem ersten Waschschrift wurden die Zellen erneut resuspendiert und eine Zellzählung (wie in Abschnitt 4.2.5 beschrieben) durchgeführt. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen zu 5×10^5 Zellen pro 90 μ L in 3 %iger BSA-Lösung aufgenommen und jeweils 90 μ L der erhaltenden Suspension pro Well in eine 96-Well-Platte pipettiert. Innerhalb der BSA-Lösung wurden nun über einen Zeitraum von 15 min die unspezifische Bindungsstellen abgesättigt. Anschließend wurden 25 μ L primärer Antikörper in 1 %iger BSA-Lösung (1 μ g Antikörper pro 10^6 Zellen) pro Well hinzugefügt und die Zellen resuspendiert. Die Zellen wurden für 45 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss mit dem primären Antikörper inkubiert. Es folgte ein Waschschrift und die Wiederaufnahme in 90 μ L Waschpuffer. Anschließend wurden 10 μ L sekundärer Antikörper pro Well zugegeben (die Startverdünnung der verwendeten Antikörper ist 1:200). Die Zellen wurden erneut in Suspension gebracht und für 35 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Es folgten zwei Waschschriffe und eine Aufnahme der Zellen in 100 μ L Waschpuffer. Die Zellen konnten nun am Durchflusszytometer vermessen werden.

4.4.5.3. Durchflusszytometrie interner Strukturen

Für die Durchflusszytometrie interner Strukturen wurde eine nach Barbosa et. al. modifizierte Variante verwendet. (328). Dementsprechend wurde mit $0,5-1,0 \times 10^6$ Zellen pro Well gearbeitet. Im ersten Schritt wurden die Proteine der Zelle fixiert. Dazu wurden die Zellen für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 2 %iger Paraformaldehyd-Lösung inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen bei 310 g, 4 °C über 4 min abzentrifugiert und mit Glycin-Lösung (0,1 M) gewaschen. Der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt und die Zellen in Triton-Lösung (0,001 %) oder Saponin-Lösung (0,01 %), abhängig vom gewünschten Aufschluss der Zellen (Triton zur Isolation der zytosolische Fraktion und Saponin zum zusätzlichen Aufschluss der nukleären Fraktion), aufgenommen. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen erneut zentrifugiert, mit Glycin-Lösung (0,1 M) gewaschen und in der finalen Konzentration ($0,5-1,0 \times 10^6$ Zellen/Well) in Glycin-Lösung (0,1 M) wieder aufgenommen. Nach Zentrifugation bei 1370 g für 5 min bei 4 °C wurden die Zellen mit 25 μ L primärem Antikörper (1:100 in BSA-Lösung (1 %)) versetzt und für zwei Stunden inkubiert. Die Zellen wurden mit BSA-Lösung (1 %)

gewaschen und mit 10 µL sek. Antikörper versetzt (1:200 in BSA-Lösung (1 %)) und für weitere zwei Stunden unter Lichtausschluss inkubiert. Es erfolgte ein erneutes Waschen mit BSA-Lösung (1 %), bevor die Zellen im finalen Volumen BSA-Lösung (100 µL/Well) wieder aufgenommen wurden. Anschließend wurde die Platte am Durchflusszytometer vermessen.

4.4.5.4. Auswertung

Dargestellt ist der Mittelwert des Fluoreszenzmittelwerts (+SD) bereinigt um die unspezifischen Bindungen des sekundären Antikörpers. Die Messungen wurden als Duplikate in mindestens drei unabhängigen Experimenten durchgeführt (n = 3). Die statistische Analyse erfolgte mittels 1way ANOVA mit anschließendem Tukey Post-hoc Test. Das Signifikanzniveau wird mittels Asteriskus dargestellt wie folgt: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

4.5. MTT Zellviabilitätsassay

4.5.1. Allgemein

Dem MTT-Assay liegt die Tatsache zu Grunde, dass lebende Organismen bis zu ihrer kleinsten Einheit der Zelle, Stoffwechsel betreiben. Innerhalb der meisten Zellen übernehmen die Mitochondrien diese Aufgabe, indem sie im Zuge der Atmungskette mittels Elektronentransport aus ADP ATP erzeugen, welches als Energieträger für eine Vielzahl von weiteren Stoffwechselprozessen essentiell ist. Es liegt also nahe, die mitochondriale Aktivität der Zellen zu vermessen, um Aussagen über ihre Viabilität treffen zu können. Für die Vermessung stehen heutzutage unterschiedliche Möglichkeiten zur Verfügung. Eine davon stellt die Verstoffwechselung des Farbstoffes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid (MTT) dar. Durch die Verstoffwechselung innerhalb der Mitochondrien wird mittels reduktiver Prozesse ein wasserunlösliches Formazan gebildet.

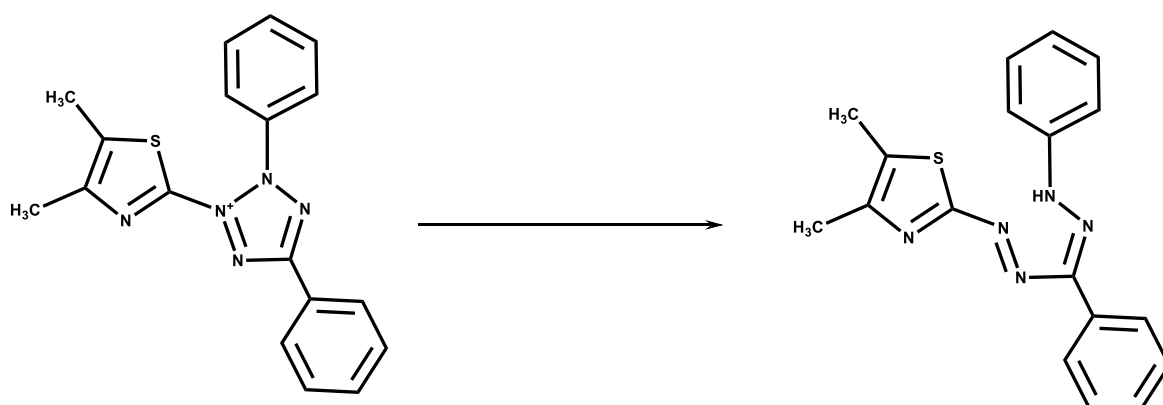


Abbildung 18: Reduktion von MTT zu Formazan.

Das Formazan kann durch die Zugabe von DMSO in Lösung gebracht werden. Die Formazan-Kristalle weisen eine violette Färbung auf, die sich auf die entstehende Lösung überträgt. Die Farbintensität ist dabei dem Lambert-Beer'schen Gesetz nach direkt proportional zur Menge an gebildetem Formazan und somit zur Zellviabilität. Der Multiwellreader erfasst die Absorption bei 570 nm (Messwert) und bei 690 nm (Hintergrundsignal durch Medium- und/oder Serum- Rückstände) (329,330).

4.5.2. Praktische Durchführung

Zu Beginn des Experiments wurden die Zellen in einer 96-Well Platte zu je 2000 Zellen in 90 μ L pro Well (für die hier verwendeten MCF-7-, MCF-7-kd- und MCF-7-sc-Zellen gültig) ausplattiert. Da nur die inneren 60 Wells der 96-Well-Platte benötigt werden, wurde in den verbleibenden Kranz um die inneren Wells eine Reihe aus PBS pipettiert, der als Verdunstungsschutz diente. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 10 μ L einer logarithmischen Verdünnungsreihe von links nach rechts beginnend mit PBS als niedrigste Konzentration bis hin zur höchsten Zytostatikakonzentration beimpft (Abbildung 19). Um nun Behandlungen, Zelllinien, Inhibitoren etc. vergleichen zu können, wurden die Reihen B/C/D, sowie die Reihen E/F/G als Triplikate gleichbehandelt. Für jedes Well ergab sich somit ein Endvolumen von 100 μ L.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS
B	DPBS	DPPS	-6,5	-6,0	-5,5	-5,0	-4,5	-4,0	-3,5	-3,0	SL	DPBS
C	DPBS	DPPS	-6,5	-6,0	-5,5	-5,0	-4,5	-4,0	-3,5	-3,0	SL	DPBS
D	DPBS	DPPS	-6,5	-6,0	-5,5	-5,0	-4,5	-4,0	-3,5	-3,0	SL	DPBS
E	DPBS	DPPS	-6,5	-6,0	-5,5	-5,0	-4,5	-4,0	-3,5	-3,0	SL	DPBS
F	DPBS	DPPS	-6,5	-6,0	-5,5	-5,0	-4,5	-4,0	-3,5	-3,0	SL	DPBS
G	DPBS	DPPS	-6,5	-6,0	-5,5	-5,0	-4,5	-4,0	-3,5	-3,0	SL	DPBS
H	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS

Abbildung 19: Beispielhafte Aufteilung eines MTT-Assay. Gezeigt ist die Zugabe der logarithmischen Verdünnungsreihe von CDDP. Beginnend mit DPBS als 0 Wert und endend mit Stammlösung (SL). Die äußerste Plattenreihe enthält den Verdunstungsschutz aus DPBS.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden CDDP und MX zum Beimpfen verwendet. Es ergaben sich für CDDP und MX die folgenden Verdünnungsreihen:

Tabelle 2: Logarithmische Verdünnungsreihe Cisplatin aufsteigend von links nach rechts.

Lösung	PBS	-6,5	-5,5	-5,0	-4,5	-4,0	-3,5	-3,0	-2,5	SL (-2,3)
Konz Well	-9,5	-7,5	-6,5	-6,0	-5,5	-5,0	-4,5	-4,0	-3,5	-3,3

Stammlösung: 5 mM

Tabelle 3: Logarithmische Verdünnungsreihe Mitoxantron aufsteigend von links nach rechts.

Lösung	PB	-7,5	-7,0	-6,5	-6,0	-5,5	-5,0	-4,5	-4,0	-3,5
	S									
Konz		-9,5	-8,5	-8,0	-7,5	-7,0	-6,5	-6,0	-5,5	-5,0
Well										

Stammlösung: 4,5 mM

Tabelle 1 und 2 geben die logarithmischen Verdünnungsreihen für CDDP und MX an. Zur Herstellung der Verdünnungsreihen wurden beide Stammlösungen in die Arbeitslösungen (-2,5 und -3,0) überführt (siehe 4.1.2). Anschließend konnte jede Arbeitslösung durch 1:10-Verdünnung in weitere Verdünnungsstufen überführt werden.

Anschließend wurden die Platten für 72 h bei 37 °C unter 5 % CO₂- Atmosphäre im Inkubator gelagert. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Platten entnommen und mit 20 µL MTT-Reagenz (5 mg/mL) pro Well versetzt. Die Zellen wurden nun eine weitere Stunde inkubiert. Anschließend konnten die Platten ausgeschlagen und die gebildeten Formazan-Kristalle in 200 µL DMSO aufgenommen werden. Die Platten konnten nun am Multiwellreader (Multiskan[®] EX) in einem kolorimetrischen Verfahren vermessen werden.

Für die durchgeführten Experimente war es mitunter nötig, die Zellen vor Durchführung des MTT-Assays mit einem Aktivator oder einem Inhibitor zu versetzen. Die folgende Tabelle 4 gibt Auskunft über Inkubationszeiträume und Endkonzentrationen der verwendeten Substanzen.

Tabelle 4: Inkubationszeitraum und resultierende Endkonzentrationen der verwendeten Inhibitoren im MTT Assay.

Bezeichnung	Inkubationszeitraum	Endkonzentration
Mangan(II)chlorid-	5 min dann	1 mM
Arbeitslösung (10 mM)	Mediumwechsel	
FAK14	76 h	1 µM
Inhibitor-Arbeitslösung		

(10 µM)		
SHC772984-	76 h	250 nM
Arbeitslösung (2,5 µM)		
UO126-Arbeitslösung	76 h	5 µM
(50 µM)		
666-15-Arbeitslösung	76 h	100 nM
(1 µM)		

4.5.3. Auswertung

Die Versuche wurden in Triplikaten zu mindestens $n = 3$ durchgeführt und anschließend zur graphischen Darstellung als sogenannte *dose response*-Kurve aufgetragen. Am Wendepunkt der sigmoidal verlaufenden Kurven kann die inhibitorische Konzentration 50 % (IC_{50}) der verwendeten Behandlung bestimmt werden. Die IC_{50} gibt an, bei welcher Konzentration 50 % der Zellen gestorben sind. Da die Absorption gegen die logarithmische Verdünnungsreihe aufgetragen wird, ist es nötig zu entlogarithmieren um die Konzentration zu erhalten.

Die Messungen wurden mindestens als Triplikate in mindestens drei unabhängigen Experimenten durchgeführt ($n = 3$). Abgebildete MTT-Graphen zeigen einen exemplarischen Kurvenverlauf dieser Messungen.

$$RF = \frac{IC_{50} \text{ (Zellen behandelt)}}{IC_{50} \text{ (Zellen unbehandelt)}}$$

Formel 4: Berechnung des Resistenzfaktors

Der RF-Wert setzt sich aus dem Vergleich der IC_{50} behandelter und unbehandelter Zellen des gleichen Ansatzes zusammen und wird nach Formel 4 berechnet. Ist der RF-Wert

kleiner 1, so handelt es sich um eine Sensitivierung der Zellen, ist er größer 1, so spricht man von einer Desensitivierung bzw. Resistenzbildung. Die statistische Auswertung erfolgte mittels gepaartem t-Test. Angegeben ist die Standardabweichung (SD), das Signifikanzniveau wird mittels Asteriskus dargestellt wie folgt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.6. Transfektionsassays

4.6.1. Allgemein

Den im Folgenden beschriebenen Techniken der Detektion von zellinternen Signalprozessen liegt die vorhergehende genetische Modifikation der Zielorganismen zugrunde. Grundsätzlich handelt es sich dabei um das Einbringen von Fremd-DNS in einen Zielorganismus, hier humane Melanom- und Mammakarzinomzellen. Die DNS wird dabei in Form eines Plasmids auf den Wirt übertragen. Dies kann über verschiedene Techniken realisiert werden. Für diese Arbeit wurden zwei gängige, aber grundsätzlich verschiedene Methoden verwendet. In diesem Abschnitt soll zunächst die Transfektion mit einem Transfektionsreagenz erklärt werden, unter 4.7 wird die virale Transduktion erläutert. Bei der Transfektion mit FuGENE® HD handelt es sich um die Transfektion mit einem nicht liposomalen Transfektionsreagenz. Diese Verbindungen bilden innerhalb einer wässrigen Phase einen Komplex aus DNS und Lipid, der nach Verschmelzung mit der Zellmembran die DNS ins Zellinnere entlässt. Die genaue Formulierung des Reagenz ist nicht öffentlich zugänglich. Zu beachten ist, dass das Verhältnis zwischen DNS und Transfektionsreagenz im Vorfeld bestimmt werden muss, um eine erhöhte Zelltoxizität ausschließen zu können. Für jede Zelllinie ist dabei individuell das Komponenten Verhältnis zu bestimmen.

Die Zellen wurden mit einem Reporterplasmid transfiziert, das bei Aktivierung des Zielgens *Firefly Luciferase* bildet. Für diese Arbeit wurde ein Reporterplasmid für den Wnt-Signalweg verwendet. Somit kann die Aktivität des Wnt-Signalweges aus dem Signal des Assays bestimmt werden. Lysiert man die Zellen mithilfe des ONE-Glo™ Systems zu einem Zeitpunkt X, wird diese Luciferase in Kontakt mit ihrem ebenfalls im System enthaltenen Substrat, dem Luciferin, gebracht. Bei Umsetzung dieses Substrats entsteht eine detektierbare Chemilumineszenz (Abbildung 20), die als proportionales

Signal zur Reporteraktivität, normalisiert auf die Zellzahl der Probe, ausgelesen wird. Man spricht hier vom TOPflash-Assay, da das Signal in Form eines hellen Aufblitzens von oben vermessen wird. Die Zellzahl wird dafür mithilfe des CellTiter-Fluor™ bestimmt. Dieser zweite Assay enthält Glycyl-phenylalanyl-aminofluorocoumarin, welches die Zelle aufnimmt und mittels Proteasen in einen aktiven Fluorophor spaltet. Dieser Vorgang findet nur in lebenden Zellen statt und kann anhand der entstehenden Fluoreszenz quantifiziert werden.

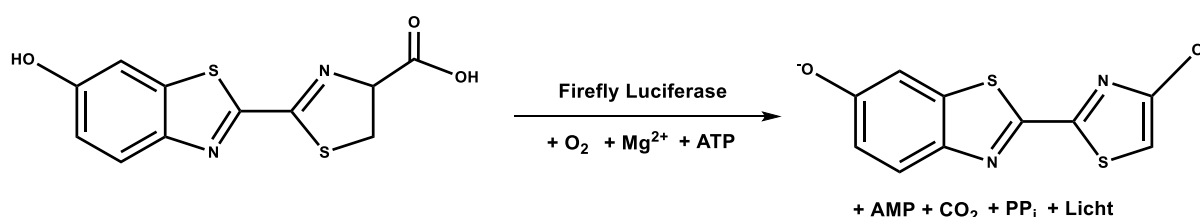


Abbildung 20: Monooxygenierung von Luciferin durch die Firefly Luciferase in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff, Magnesium-Ionen und ATP zur Erzeugung von Chemilumineszenz.

4.6.2. Transfektion von MV3-Zellen

MV3-Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion in eine 24-Well-Platte in 1 mL Vollmedium ausgesät. Zum Zeitpunkt der Transfektion zeigten die Zellen eine Konfluenz von rund 50 %. Die Zellen wurden mit FuGENE® HD und dem Vektor pGL4.49[luc2P/TCF-LEF/Hygro] transfiziert. Grundsätzlich wurde nach den Angaben des Herstellers gearbeitet, lediglich die folgenden Parameter wurden vom Experimentator festgelegt. Das Verhältnis zwischen FuGENE® HD zur DNS lag bei 4,0 : 1. 48 h nach der Transfektion wurde das Medium zu Selektionsmedium (pGL4.49[luc2P/TCF-LEF/Hygro] Vector) gewechselt und die Zellen bis zum erneuten Erlangen der fast vollständigen Konfluenz kultiviert. Anschließend wurden die Zellen zum „Picken“ von *single clonen* in einer 96well Platte ausgeeinzelnt. Nach Kultivierung und Vermehrung wurden aus diesen *single clones* Backups erstellt und bei -80 °C bis zu ihrer Vermessung gelagert.

4.6.3. Vermessung und Auswertung – TOPflash-Assay MV3

Zur Durchführung des TOPflash-Assays wurden 1×10^5 Zellen in eine weiße Nunc™ F96 MicroWell™ Polystyrolplatte in einem Volumen von 100 µL Selektionsmedium ausgesät. Die Zellen wurden je nach Inkubationsmethode vorbehandelt (siehe Tabelle 6) und nach 72 h Inkubation mit 20 µL CellTiter-Fluor™ versetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend ließ sich am FLUOstar Optima Reader die Fluoreszenz als Maß der Zellviabilität auslesen. Dies diente der späteren Normalisierung. Die Proben wurden bei 390 nm angeregt und die Emission bei 520 nm vermessen. Da es sich um ein *multiplex* Verfahren handelt (mehrere Assays können hintereinander verwendet werden), konnte im Anschluss 100 µL ONE-Glo™ direkt hinzugegeben werden. Nach fünfminütiger Lyse konnte die resultierende Lumineszenz ausgelesen werden.

Tabelle 5: Inkubationsschema der Proben für den MV3 TOPflash-Assay.

Bezeichnung	Behandlung (Endkonzentration)	Inkubationsdauer
WT	CDDP (2 µM)	72 h
Kollagen	Kollagen Typ I + CDDP (2 µM)	72 h
Mangan	Mangan(II)chlorid (1 mM) + CDDP (2 µM)	5 min mit MnCl ₂ dann 72 h
Kollagen und Mangan	Kollagen Typ I + Mangan(II)chlorid (1 mM) + CDDP (2 µM)	5 min mit MnCl ₂ dann 72 h

Zur Normalisierung der erhaltenen Werte wurden die Fluoreszenzintensitäten der CellTiter-Fluor™ Messung verwendet. Jedem Well ist eine Fluoreszenz und somit eine Zellviabilität zugeordnet. Bezieht man nun alle Fluoreszenzwerte auf einen willkürlich als 100 % definierten Wert dieser Gesamtheit an Werten (in dieser Arbeit wurden dafür die Werte der unbehandelten Zellen verwendet), so erhielt man für jedes Well einen Faktor zur Normalisierung und somit die normalisierte Lumineszenzintensität. In Tabelle 6 ist die Normalisierung an einem Beispiel erklärt. Da in diesem Beispiel unter der Behandlung + Kollagen 20 % mehr Zellen gewachsen sind als in der Kontrollgruppe (CTR), wie aus den Fluoreszenzwerten ersichtlich wird, müssen die erhaltenden Lumineszenzwerte der + Kollagen Gruppe um den Faktor 0,83 bereinigt werden, um den normalisierten Wert zu erhalten.

Die Messungen wurden als Duplikate in mindestens drei unabhängigen Experimenten durchgeführt (n = 3). Geprüft auf statistische Signifikanz wurde mittels 1way ANOVA mit anschließendem Tukey Post-hoc Test. Das Signifikanzniveau wird mittels Asteriskus dargestellt wie folgt: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

Tabelle 6: Beispielhafte Normalisierung einer TOPflash – Assay Messung.

Behandlung	Fluoreszenz	Lumineszenz	Faktor	Lumineszenz (normalisiert)
CTR	100	50	1	50
+ Kollagen	120	50	0,83	41,5

4.6.4. Transfektion von MCF-7-Zellen

Da die MCF-7-Zellen mit den zur Verfügung stehenden Methoden nicht stabil transfiziert werden konnten, liegt diesem Versuch eine transiente Transfektion zugrunde. Die Transfektion ist somit nur zeitlich begrenzt, bevor die Zellen ihre transfizierten Eigenschaften wieder verlieren. Unter Verwendung des *Cignal TCF/LEF Reporter Assay Kit (LUC)* wurden die Zellen in eine 24-Well-Platte zu 40.000 Zellen in 500 µL Vollmedium /Well ausgebracht. Nach dem Anwachsen der Zellen wurde das Medium getauscht und die Zellen mit dem Transfektionskomplex inkubiert. Für den Transfektionskomplex wurden 200 µL DMEM Nährmedium (ohne Zusätze) mit 1,1 µL FuGENE® HD und 1,1 µL DNS Konstrukt versetzt und zehn Minuten bei

Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Transfektionskomplex auf die Zellen gegeben. Dem *Signal TCF/LEF Reporter Assay Kit (LUC)* liegen drei DNS-Konstrukte bei (Abb. 3). Erstens die Positivkontrolle mit konstitutiven CMV Promotoren (Cytomegalievirus) für beide Luciferasen, zweitens die Negativkontrolle, bei der nur der CMV Promotor der *Renilla Luciferase* zugänglich ist, und drittens der Testvektor mit CMV Promotor für die *Renilla Luciferase* und dem *test response element* (TRE), dass die Transkription der *Firefly Luciferase* kontrolliert. Die Positivkontrolle enthielt zusätzlich eine Gensequenz, die für die Expression von *Green Fluorescent Protein* (GFP) codiert (Monster GFP). Da dieses ebenfalls CMV gesteuert ist, ist es möglich die Transfektionseffizienz fluoreszenzmikroskopisch zu überprüfen.

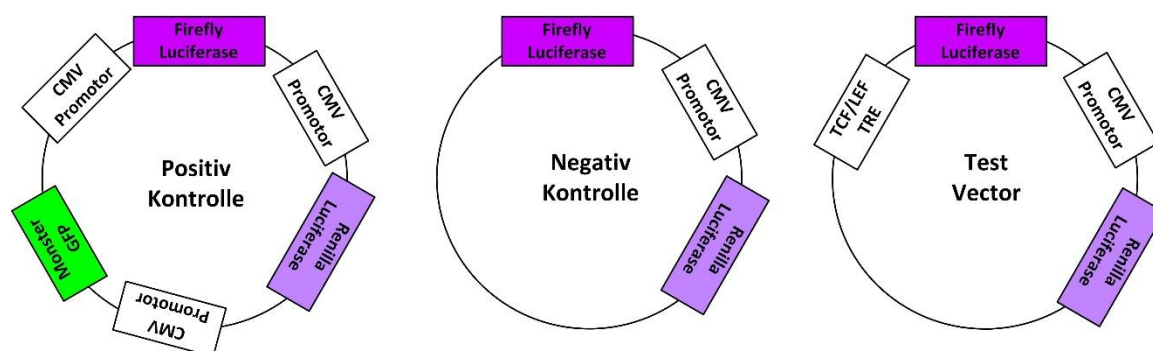


Abbildung 21: im Signal TCF/LEF Reporter Assay Kit (LUC) enthaltene Vektoren.

Pro 24-Well-Platte wurden alle Messwerte in Duplikaten erzeugt. Somit wurden zwei Wells mit Positivkontrolle, zwei mit Negativkontrolle und die verbleibenden 20 Wells mit dem Testplasmid versetzt. Nach 24 stündiger Inkubation wurde der Transfektionskomplex am nächsten Tag entfernt und die Zellen mit 1 mL Vollmedium weiter inkubiert. Gleichzeitig wurden zur Kontrolle der Transfektionseffizienz fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen herangezogen. Die Transfektionseffizienz sollte bei ca. 80 % liegen, um eine optimale Beurteilung der Ergebnisse gewährleisten zu können und wird anhand der Mikroskop Bilder abgeschätzt (Abbildung 22).

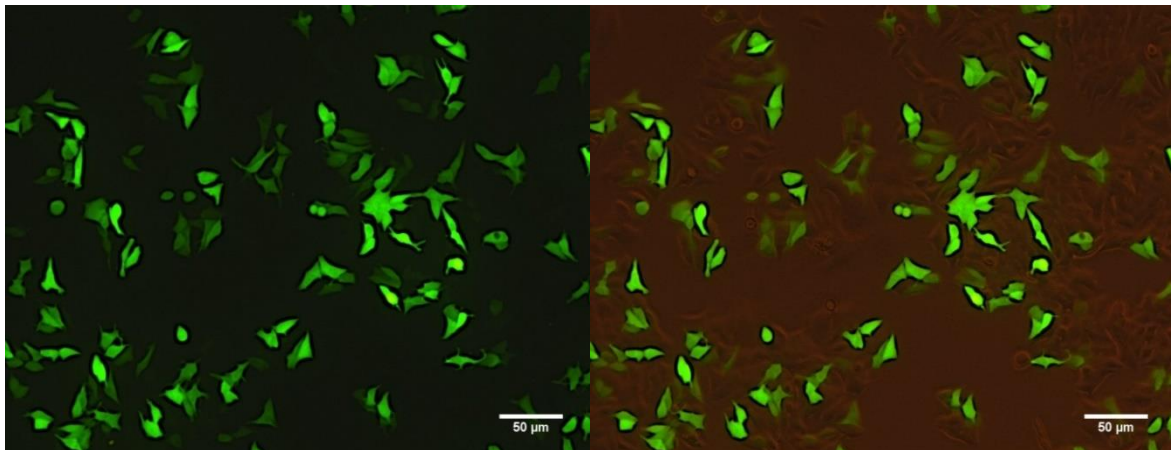


Abbildung 22: Bestimmung der Transfektionseffizienz mittels fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen; links) GFP Fluoreszenz der transfizierten Zellen nach 24 h; rechts) Transfizierte und untransfizierte Zellen als Überlappung aus Fluoreszenz- und Durchlichtmikroskopie.

Die Inkubation im Vollmedium erfolgte für 8 h, bevor die Inkubation der Zellen mit den zu untersuchenden Behandlungen gestartet wurde. Die einzelnen Inkubationen sind Tabelle 6 zu entnehmen. Nach 72-stündiger Inkubation konnten die Zellen mittels TOPflash-Assay vermessen werden, wobei eine Kombination aus ONE-Glo™ Luciferase Assay System und Renilla-Glo® Luciferase Assay System zur Anwendung kommt.

Tabelle 7: Inkubationsschema der Proben für den MCF-7 TOPflash-Assay.

Bezeichnung	Behandlung (Endkonzentration)	Inkubationsdauer
Wt	+ MX (IC ₅₀)	72 h
Kollagen	Kollagen Typ I + MX (IC ₅₀)	72 h
Mangan	Mangan(II)chlorid (1 mM) + MX (IC ₅₀)	5 min mit MnCl ₂ dann 72 h

Kollagen und Mangan	Kollagen Typ I + Mangan(II)chlorid (1 mM) + MX (IC ₅₀)	5 min mit MnCl ₂ dann 72 h
Lithiumchlorid	Lithium(I)chlorid (50 mM) + MX (IC ₅₀)	72 h gesamt und 12 h vor Inkubationsende Zugabe von LiCl

4.6.5. Vermessung und Auswertung – TOPflash-Assay MCF-7

Die entsprechend dem Abschnitt 4.6.4 behandelten Zellen wurden in ihrem Well mit 100 µL GloLysis Buffer lysiert und nach fünf Minuten mithilfe eines Zellschabers von der Wandung abgelöst. Das Lysat wurde 50:50 aufgeteilt und in die Wells einer weißen Nunc™ F96 MicroWell™ Polystyrolplatte überführt. Die eine Hälfte der Zellsuspension wurde mit 50 µL OneGlo™ die andere Hälfte mit 50 µL Renilla-Glo® Luciferase Assay Reagenz versetzt und nach fünfminütiger Inkubation im FLUOstar Optima Reader vermessen. Anschließend wurden alle Renilla-Glo® Proben auf den willkürlich festgelegten Wert von 1×10^5 normalisiert. War der Renilla-Glo® Wert unter 1×10^5 , so ergab sich ein Faktor größer 1 und umgekehrt. Anhand dieser Faktoren ließ sich, wie auch bereits bei den MV3-Zellen unter 4.6.3 besprochen, der Faktor einer unterschiedlichen Zellkonfluenz effektiv ausschließen. Die so normalisierten ONE-Glo™ Lumineszenz Werte konnten für die statistische Auswertung verwendet werden. Die Messungen wurden als Duplikate in mindestens drei unabhängigen Experimenten durchgeführt (n = 3). Zusätzlich wurden positiv und negativ Kontrolle vermessen um die maximale Aktivierung des Assay abzubilden sowie einen unteren Grenzwert zu definieren. Geprüft wurde anschließend mittels 1way ANOVA mit anschließendem Tukey Post-hoc Test auf statistische Signifikanz. Das Signifikanzniveau wurde mittels Asteriskus wie folgt dargestellt: * P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001.

4.7. Transduktion – Etablierung einer β 1-Integrin *knock-down* Zelllinie

4.7.1. Allgemein

Bei einer Transduktion handelt es sich um die Einbringung von Fremd-DNS mittels viraler Partikel in eine Wirtszelle. Das zugrunde liegende Prinzip beruht auf der Fähigkeit von Viren, ihr genetisches Material in Zielzellen einzubringen und in das dortige Genom zu integrieren. Bei den verwendeten Partikeln handelt es sich um modifizierte Lentiviren, die nicht mehr zur eigenen Replikation befähigt sind und die gewünschte DNS Sequenz in den viralen Vektor integriert haben. Sie eignen sich vor allem für die Transduktion von Primärzellen wie z.B. Endothelzellen. Da die Viren nicht mehr replikationsfähig sind, ist es nötig die Zellen mit einem Vielfachen an Viren zu versetzen, damit die gewünschte Gensequenz effektiv in das Wirtsgenom integriert wird. Üblicherweise beinhaltet die integrierte Gensequenz mehrere Kopien der gewünschten DNS Abschnitte, um möglichst hohe Level an Ziel-RNA zu ermöglichen. Der hier verwendete Vektor codiert für zwei Merkmale, die den Zielorganismus anschließend definieren. So enthält er codierende Abschnitte für eine Puromycinresistenz und eine *small hairpin RNA* (shRNA) gerichtet gegen die β 1-Integrin-Sequenz. Bei Puromycin handelt es sich um ein Nukleosid-Antibiotikum, das die Proteinbiosynthese in eukaryotischen Zellen hemmt. Die erfolgreich transduzierten Zellen sind in der Lage, Puromycin-N-Acetyltransferase (PAC) zu bilden, die das dem Zellmedium zugesetzte Puromycin deaktiviert. Die Zellen lassen sich dementsprechend in Puromycin-haltigem Medium selektionieren. Eine ständige Behandlung mit Puromycin gewährleistet, dass die Zellen ihre transduzierten Eigenschaften nicht wieder verlieren. Folglich wird mit Puromycin versetztes Medium als Selektionsmedium bezeichnet. Dabei ist entscheidend, dass vor der Transduktion mithilfe einer *Killcurve* die Toxizität von Puromycin bestimmt wird.

Als zweites Merkmal wird in den Zellen eine sh-RNA gebildet, die der Runterregulierung des β 1-Integrins, einem zellulären Oberflächenprotein, dient. Die shRNA bindet innerhalb des Nukleus die *messenger RNA* (mRNA), die für die Translation des β 1-Integrin Proteins verantwortlich ist und blockiert somit die β 1-Integrin Bildung. Dieser Vorgang wird als *knock-down* bezeichnet, da in seiner Folge die Dichte an funktionierenden β 1-Integrinen stark reduziert wird. Diesem Verfahren gegenüber steht

der *knock-out* von Genen, bei dem der DNS Abschnitt selbst betroffen ist und bspw. durch CRISPR/CAS9 komplett aus der Zelle entfernt wird. Zusätzlich ist es erforderlich, die Zellen mit *Control shRNA Lentiviral Particles-A* zu transduzieren um eine Veränderung des Phänotyps rein durch die Transduktion auszuschließen. Die *Control shRNA Lentiviral Particles-A* sorgen dabei dafür, dass in der Zelle eine Folge funktionsloser RNA gebildet wird (scrambled RNA), die die Zelle nicht beeinflussen darf. Auch die MCF-7-sc-Zellen besitzen eine Puromycinresistenz.

4.7.2. Puromycin Killcurve

Für die Erstellung einer Puromycin *Killcurve* wurden die Zellen in einer 24-Well-Platte ausgesät und anschließend mit steigenden Dosen an Puromycin versetzt. Nach einer Woche ließ sich durch optische Kontrolle feststellen, welche die optimale Puromycin Konzentration war. Bei dieser Optimaldosis waren nach einer Woche alle Zellen abgestorben. Aus diesen Vorversuchen ergaben sich eine minimale und eine maximale Puromycindosis. Bei der Minimaldosis waren nach einer Woche Inkubation die geringsten visuellen Effekte der Behandlung sichtbar, während bei der Maximaldosis bereits nach drei Tagen alle Zellen gestorben waren.

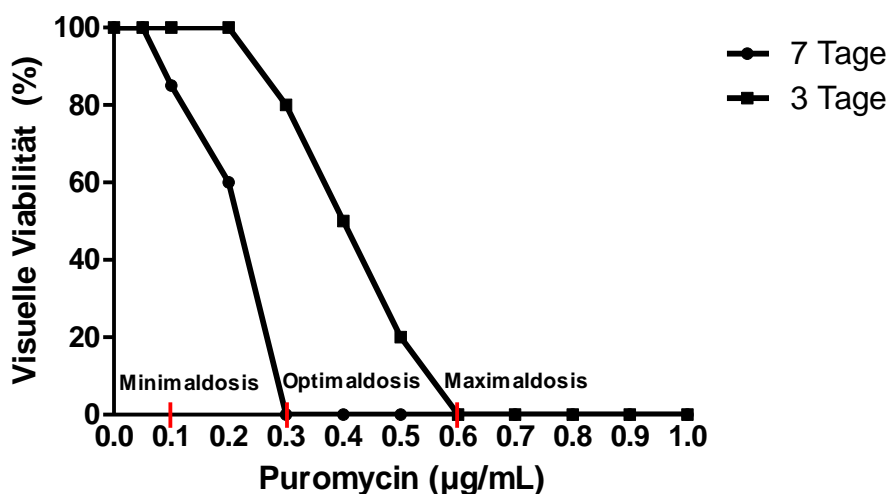


Abbildung 23: Minimal-, Optimal- und Maximaldosis bei Inkubation mit Puromycin von MCF-7-Zellen vor viraler Transduktion, nach drei Tagen (Vierteck) und nach sieben Tagen (Kreis).

Nach der erfolgreichen Transduktion wurde erneut eine *Killcurve* erstellt und die Dosis Puromycin angepasst. Die MCF-7-Zellen wurden von nun an mit 0,5 µg/mL Puromycin versetzt. Zusätzlich zeigte sich, dass die Zellen bis zu dreifach höheren Dosen als die nicht-transduzierten Zellen vertragen (Höchstdosis).

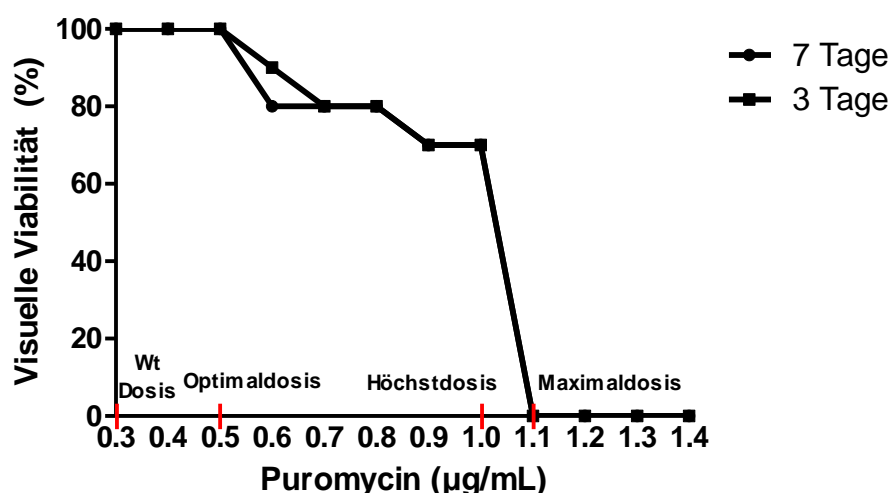


Abbildung 24: Optimal-, Höchst- und Maximaldosis bei Inkubation mit Puromycin von MCF-7 Zellen nach viraler Transduktion, nach drei Tagen (Viereck) und nach sieben Tagen (Kreis); zusätzlich eingezeichnet die Wt Dosis (Optimaldosis vor der Transfektion).

4.7.3. Transduktion von MCF-7- und MV3-Zellen

Für die Transduktion wurden 1000 MCF-7-Zellen sehr niedriger Passage in einem Well einer CytoOne® 96-Well-Platte ausgesät und über 24 h in Vollmedium kultiviert. Am zweiten Tag wurde Medium mit Polybrene (4 µg/mL) versetzt und 100 µL dieser Mischung pro Well zugesetzt. Polybrene dient dabei als polykationisches Reagenz, das negative Ladungen zwischen der Zelloberfläche und dem viralen Kapsid absättigt. Im nächsten Schritt wurden die viralen Partikel aufgetaut, durchmischt und abhängig von der Multiplizität der Infektion (MOI) zugegeben. Für MCF-7-Zellen ist in der Literatur eine MOI von 60 angegeben. Dementsprechend wurden dem Medium 12 µL Integrin β1 siRNA (h) lentivirale Partikel und in einem weiteren Well 12 µL *Control shRNA Lentiviral Particles-A* zugegeben. Zusätzlich zu diesen beiden Wells wurden zwei weitere Wells beimpft und als Kontrollen verwendet. Um einen schädlichen Einfluss des Polybren auf die Zellen auszuschließen wurde das erste Well der Kontrollen lediglich mit Polybren-haltigem Medium versetzt. Das zweite Well wurde mit normalem Medium inkubiert und zusammen mit den übrigen Proben 24 h nach der Transduktion auf ein

Selektionsmedium umgestellt. Durch die Zugabe von Puromycin konnten stabile Klone selektiert werden.

Das Medium mit den infektiösen Viren dieses Ansatzes wurde erneut benutzt um einen weiteren Ansatz in selber Weise zu transduzieren (als Tag 2 bezeichnet in den folgenden Ausführungen).

Über einen Zeitraum von vier Wochen wurden die Zellen weiter kultiviert und dabei immer wieder in größere Wachstumsplatten und Zellkulturfalschen überführt, bis eine Zellzahl von ca. 10^6 erreicht wurde und Backups erstellt werden konnten. Dabei wuchs die Polybren-Kontrolle im Vollmedium analog normaler MCF-7-Zellen. Die Puromycinkontrolle verstarb erwartungsgemäß nach einem Inkubationszeitraum von einer Woche.

Für die MV3-Transduktion wurde analog vorgegangen. Der MV3 *knock-down* wurde von Maria Bethania Piva erstellt, die diese Zellen für die vorliegende Arbeit zu Verfügung stellte.

4.7.4. Validierung des β 1-Integrin *knock-down*

Um die Effektivität des β 1-Integrin *knock-downs* zu validieren wurden die transduzierten Zellen lysiert und die β 1-Integrin-Untereinheit geblotet (Abbildung 25). Dabei wurde entsprechend der Angaben des Herstellers ein nicht-reduzierender Laemlipuffer verwendet, um die Bindungsstelle des Antikörpers intakt zu halten.

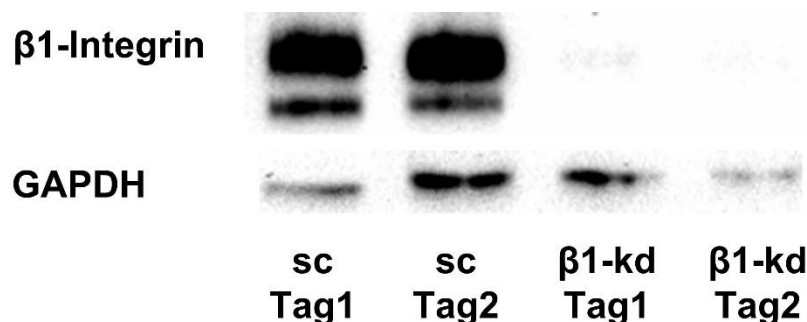


Abbildung 25: Westernblot zur Überprüfung des erfolgreichen knock-downs von β 1-Integrinen in MCF-7-Zellen; gezeigt sind die MCF-7-sc (sc) und die MCF-7-kd (β 1-kd).

Erwartungsgemäß wiesen MCF-7-sc eine hohe Dichte an $\beta 1$ -Integrinen auf, während sich in den MCF-7- $\beta 1$ -kd eine fast vollständige Reduzierung zeigte. Der *knock-down* war dementsprechend hoch effektiv und führte nahezu zu einem *knock-out*.

5. Ergebnisse und Diskussion

Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Arbeit besprochen und in den Kontext anderer wissenschaftlicher Arbeiten eingeordnet. Dabei werden durch einen Vergleich der beiden untersuchten Tumorentitäten MCF-7-Mammakarzinom- und MV3-Melanomzellen, Übereinstimmungen und Unterschiede herausgearbeitet.

5.1. Zugrunde liegende Untersuchungen

Die Grundlage für die hier untersuchten *signaling*-Phänomene bilden die funktionellen Resistenzuntersuchungen vorangegangener und paralleler wissenschaftlicher Arbeiten, die in den Dissertationen und Veröffentlichungen von Frau Bethania Piva und Herrn Fabian Baltes zu finden sind. Diese Arbeiten zeigen, dass sowohl MV3-, als auch MCF-7-Zellen unter dem Einfluss einer Integrinaktivierung durch Kollagen, im Rahmen einer CAM-DR resistenter gegenüber einer Behandlung mit Zytostatika werden. Zusätzlich liegt die Vermutung nahe, dass Mangan als positiver Induktor der Konformationsänderung von Integrinen hin zum hochaffinen Bindungsstatus ebenfalls eine CAM-DR-Bildung begünstigt, was in einem leichten Resistenzanstieg detektierbar ist. Eine Kombination beider Aktivierungsmechanismen in Zellen, stimuliert durch Mangan und inkubiert auf Kollagen, vermittelt ebenfalls eine leicht erhöhte Resistenzbildung. Abbildung 26 zeigt die erhöhten Resistenzfaktoren gegenüber CDDP, die Piva et al. in MV3-Zellen messen konnten (331).

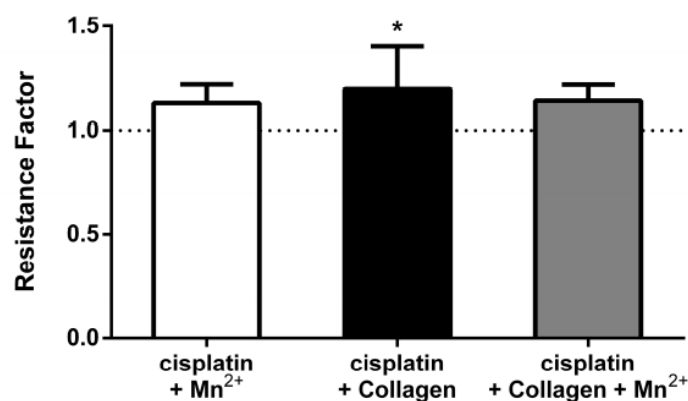


Abbildung 26: Resistenzbildung in MV3-Zellen nach CAM-DR Initiierung mit Mn²⁺ [1 mM], auf Kollagen und mit der Kombination beider Behandlungen unter CDDP nach 72 h Inkubationszeit. Aus Piva et al. (331).

Gleiche Effekte konnten für die Kollagen-Inkubation in MCF-7-Zellen gegenüber CDDP und MX beobachtet werden (332). Hier steigt die Resistenz der MCF-7-Zellen unter CDDP auf Kollagen um rund 15 % und unter MX auf Kollagen um rund 22 % an.

Die Ausprägung der primären Resistenzbildung ist somit geringer, als man sie für die Bildung genetisch bedingter sekundärer Resistenzen beobachtet. Das Auftreten primärer Resistenzen durch physiologisch vorhandene Induktoren und Prozesse ist aber umso interessanter, wenn man sich vor Augen führt, dass die primäre Resistenzbildung als Startpunkt und mögliche Voraussetzung für die Ausbildung sekundärer Resistenzen dient. Folglich stellt die Untersuchung der primären Resistenzbildung und der damit verbundenen *signaling* Prozesse über die Integrine einen wertvollen Beitrag für die Therapie und Prävention resistenter Tumore dar. Die Bestimmung strategischer Angriffspunkte im *signaling* ermöglichen es darüber hinaus, multifaktorielle Therapiestrategien einzusetzen (bspw. die simultane Blockade zweier quervernetzter Signalwege über ihren gemeinsamen Schnittpunkt), die ein späteres Auftreten adaptiver genetischer Resistenzen verhindern können. Um für die MCF-7-Zellen gezielt nach den der integrinvermittelten Resistenz zugrunde liegenden Mechanismen suchen zu können, wurde als erstes ein Screening auf Veränderungen essentieller Kinasen des humanen Proteoms vorgenommen. Der Array untersucht dabei den Phosphorylierungsstatus 43 unterschiedlicher Kinasen des humanen Proteoms und zweier dazu stark in Bezug stehender Proteine.

5.2. Screening der MCF-7-Mammakarzinomzellen

5.2.1. Einleitung

Die Ergebnisse des Arrays werden im Weiteren auf die drei Hauptsignalwege dieser Arbeit, sowie zwei weitere logisch zusammenhängende Signalwege aufgeteilt und diesen zugeordnet einzeln besprochen. Sie gliedern sich in den Wnt-Signalweg (5.2.2.1), den PI3Kinase/Akt-Signalweg (5.2.2.2) und den MAPK-Signalweg (5.2.2.3) sowie den STAT-Signalweg und weitere Kinasen (5.2.2.4).

5.2.2. Ergebnisse

5.2.2.1. Expression phosphorylierter Kinasen des Wnt-Signalweges

Der *Proteome Profiler*TM Array beinhaltet zwei Schlüsselkomponenten des Wnt-Signalweges (Abbildung 27). Untersucht wurden hier die Basislevel der MCF-7-Zellen (weiß) und die Auswirkung einer Kollageninkubation (blau). Auch die Co-Inkubation mit Kollagen und MX (blau/diagonalgestreift) sowie der Einfluss eines $\beta 1$ -*knock-down* unter der Kombination aus Kollagen und MX (türkis/diagonalgestreift) wurden getestet.

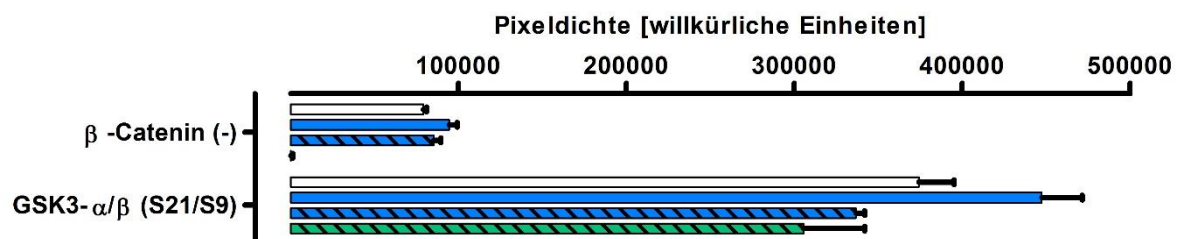


Abbildung 27: Phosphokinasen des Wnt-Signalweges; gezeigt sind unbehandelte MCF-7-Zellen (weiß), MCF-7-Zellen auf Kollagen gewachsen ohne MX (blau) und auf Kollagen mit MX [262 nM] (blau/diagonalgestreift), sowie MCF-7- $\beta 1$ -kd auf Kollagen mit MX [262 nM] (grün/diagonalgestreift) nach 72 h Inkubationszeit.

Untersucht wurde die GSK3, die in ihrer alpha- und beta-Form hinsichtlich Phosphorylierung an S21 und S9 und β -Catenin (für β -Catenin ist keine Phosphorylierungsstelle angegeben). Die GSK3-Phosphorylierung wird unter Kollagen hochreguliert, während sie unter dem zusätzlichen Einfluss von MX absinkt, ohne dass der $\beta 1$ -*knock-down* einen Einfluss zu haben scheint. Das β -Catenin hingegen blieb über die Behandlungen unverändert. Lediglich in den MCF-7- $\beta 1$ -kd Zellen scheint es zu einer nahezu vollständigen Downregulierung zukommen. Im Vergleich ist auch anzumerken, dass die Mengen an β -Catenin generell eher gering ausgeprägt sind, während ein hoher Phosphorylierungsgrad der GSK3 in den MCF-7-Zellen und ihrem MCF-7- $\beta 1$ -kd-Klon vorliegt.

Die $\beta 1$ -*knock-down*-Ergebnisse wurden dabei an einem anderen Tag als die restlichen Membranen aufgenommen und zeigten eine deutlich stärkere Belichtung der Referenzspots, wodurch eine Auswertung zum selben Zeitpunkt bezogen auf die anderen drei Membranen nicht möglich war. Um dieses Problem bestmöglich zu umgehen, wurden die Ergebnisse des $\beta 1$ -*knock-down*-Ansatzes zu einem früheren Zeitpunkt

ausgewertet, an dem die Intensität der Referenzspots der $\beta 1$ -*knock-down*-Membran dem der ausgewerteten Bezugsmembran (MCF-7 unbehandelt) in bester Näherung entsprechen.

5.2.2.2. Expression phosphorylierter Kinasen des PI3Kinase-/Akt-Signalweges

Des Weiteren bietet der *Proteome Profiler*TM Array eine Übersicht über Komponenten des PI3-Kinase/AKT-Signalweges (Abbildung 28).

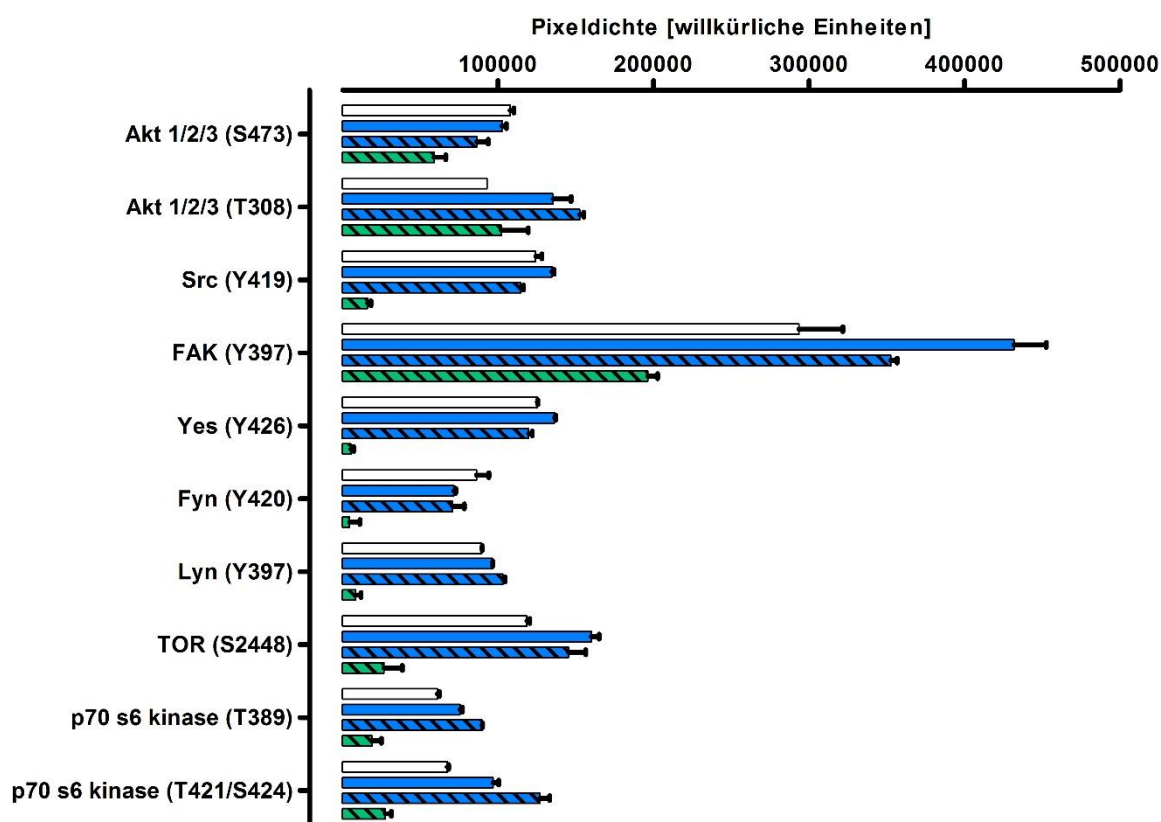


Abbildung 28: Phosphokinasen des PI3Kinase-/Akt-Signalweges; gezeigt sind unbehandelte MCF-7-Zellen (weiß), MCF-7-Zellen auf Kollagen gewachsen ohne MX (blau) und auf Kollagen mit MX [262 nM] (blau/diagonalgestreift), sowie MCF-7- $\beta 1$ -kd auf Kollagen mit MX [262 nM] (grün/diagonalgestreift) nach 72 h Inkubationszeit.

Als zentrale Schnittstelle und Schlüsselmolekül ist die Phosphorylierung der Akt 1/2/3 an den aktivierenden Phosphorylierungsstellen Ser 473 und Thr 308 untersucht worden. Die Phosphorylierung an Ser 473 scheint unbeeinflusst durch die gewählten Inkubationen, lediglich ein leichter Rückgang der Aktivierung in den MX behandelten Zellen ist zu

verzeichnen. Dafür steigt die Phosphorylierung an Thr 308 in allen Behandlungsgruppen an, verglichen mit dem Basislevel der MCF-7-Zellen. Es fällt auch auf, dass die stärkste Grundphosphorylierung in der den Integrinen direkt nachgeschalteten FAK vorliegt. Die Phosphorylierung der FAK an Tyr 397 wird durch die Anwesenheit von Kollagen stark erhöht, während der Zusatz von MX diesen Anstieg fast wieder auf das Ausgangsniveau absenkt. In den MCF-7- β 1-kd-Zellen fällt die FAK-Phosphorylierung sogar um nahezu 25 % unter das Ausgangsniveau. Sowohl Src als auch Lyn zeigen, gleichermaßen wie die FAK eine starke Abnahme der Phosphorylierung in den MCF-7- β 1-kd-Zellen. In den anderen Behandlungsgruppen jedoch zeigt sich für Src und Lyn keine Veränderung.

Da die Akt eine Vielzahl an Funktionen innerhalb der zellulären Signalweiterleitung innehat, nimmt ihre Aktivität indirekt auch Einfluss auf Proteine, die primär anderen Signalwegen zugeordnet werden, so z.B. auch Komponenten des mTOR-Signalweges. TOR, sowie die nachgeschaltete p70s6-Kinase, zeigen deutlich reduzierte Level in den MCF-7- β 1-kd-Zellen. Des Weiteren scheint eine Behandlung mit Kollagen/MX die Phosphorylierung der p70s6-Kinase geringfügig zu steigern.

5.2.2.3. Expression phosphorylierter Kinasen des MAPK-Signalweges

Abbildung 29 bietet eine Übersicht der untersuchten phosphorylierten Kinasen mit Fokus auf den MAPK-Signalweg.

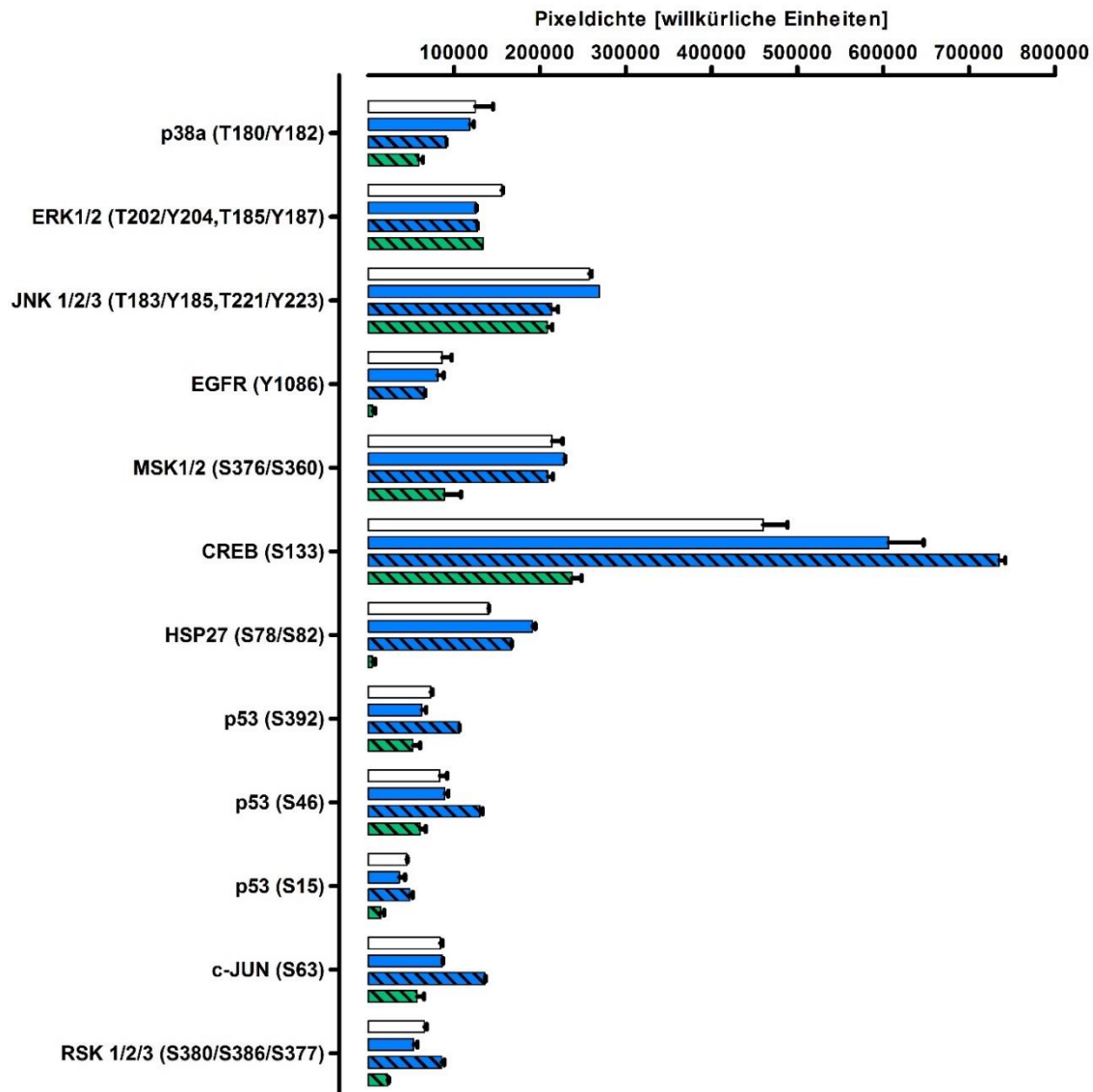


Abbildung 29: Phosphokinasen des MAPK-Signalweges; gezeigt sind unbehandelte MCF-7-Zellen (weiß), MCF-7-Zellen auf Kollagen gewachsen ohne MX (blau) und auf Kollagen mit MX [262 nM] (blau/diagonalgestreift), sowie MCF-7-β1-kd auf Kollagen mit MX [262 nM] (grün/diagonalgestreift) nach 72 h Inkubationszeit.

Die stärkste gemessene Deregulation betrifft das Protein CREB. Bereits auf dem Ausgangsniveau der MCF-7-Zellen liegt hier die höchste Signalintensität aller MAPK-Komponenten vor. Durch die Behandlung mit Kollagen nimmt die Phosphorylierung stark zu und steigt durch den weiteren Zusatz von MX weiter an, sodass im Vergleich zum Ausgangsniveau unter Kollagen/MX eine fast doppelt so starke Phosphorylierung

vorliegt. Betrachtet man nun den MCF-7- β 1-kd-Klon unter Kollagen-/MX-Behandlung mit der β 1-kompetenten Zelllinie, so zeigt sich, dass die Menge an phosphoryliertem CREB (pCREB) stark reduziert ist. Es liegt etwa 50 % unter dem Ausgangsniveau der MCF-7-Zellen. Schreitet man von hier aus rückläufig die klassische MAPK-Signalkaskade entlang, ist CREB die RSK2 direkt vorgeschaltet. Sie zeigt leichte bis keine Veränderungen unter Kollagen (mit und ohne MX), fällt aber in den MCF-7- β 1-kd Zellen ebenfalls stark ab. Geht man weiter *upstream* im *signaling*, ist es interessant festzustellen, dass für ERK1/2 in keiner der Inkubationsansätze eine merkbliche Veränderung des Phosphorylierungsgrades auftritt. Zuletzt wurde noch der EGFR untersucht als Startpunkt des klassischen MAPK-Signalweges. Die Phosphorylierung an Tyr 1086 scheint in den MCF-7- β 1-kd Zellen stark reduziert, während die anderen Inkubationsansätze nur geringfügige Veränderungen aufweisen.

Alternativ lässt sich der MAPK-Signalweg auch über Stressfaktoren und Apoptose relevante Signale aktivieren. Im Verlauf dieser Signalkaskaden werden viele Moleküle angestoßen, von denen der Array p38 α , MSK1/2, HSP27, c-JUN, JNK und p53 abdeckt. Ebenfalls wird die Proteinkinase B (Akt) aktiviert. Diese wurde bereits in Abbildung 28 dargestellt und besprochen. Auffällig ist die Zunahme der Phosphorylierung der p53 an allen drei untersuchten Phosphorylierungsstellen auf Kollagen mit MX. Ebenfalls anzumerken ist die starke Downregulierung des HSP27 in den MCF-7- β 1-kd Zellen. Aus der Gruppe der „stressaktivierten Phosphokinasen“, auch SAPK, zeigt lediglich c-JUN eine zunehmende Phosphorylierung unter Kollagen/MX, während JNK kaum beeinflusst wird.

5.2.2.4. Expression phosphorylierter Kinasen des STAT-Signalweges und weiterer Kinasen

Der Array gibt darüber hinaus Informationen zu weiteren wichtigen Phosphokinasen des intrazellulären *signalings*. Darunter befinden sich die STAT (*signal transducers and activators of transcription*), welche normalerweise über Kinasen aus der JAK- (Januskinasen) Familie reguliert werden. Abbildung 30 zeigt die Phosphorylierung aller untersuchten STAT-Kinasen, unter Angabe der dazugehörigen Phosphorylierungsstellen. Zusätzlich zeigt Abbildung 31 alle weiteren untersuchten Kinasen. Da diese Kinasen für

die spätere Diskussion keine Rolle spielen, werden an dieser Stelle ausgewählte Ergebnisse kurz abgehandelt.

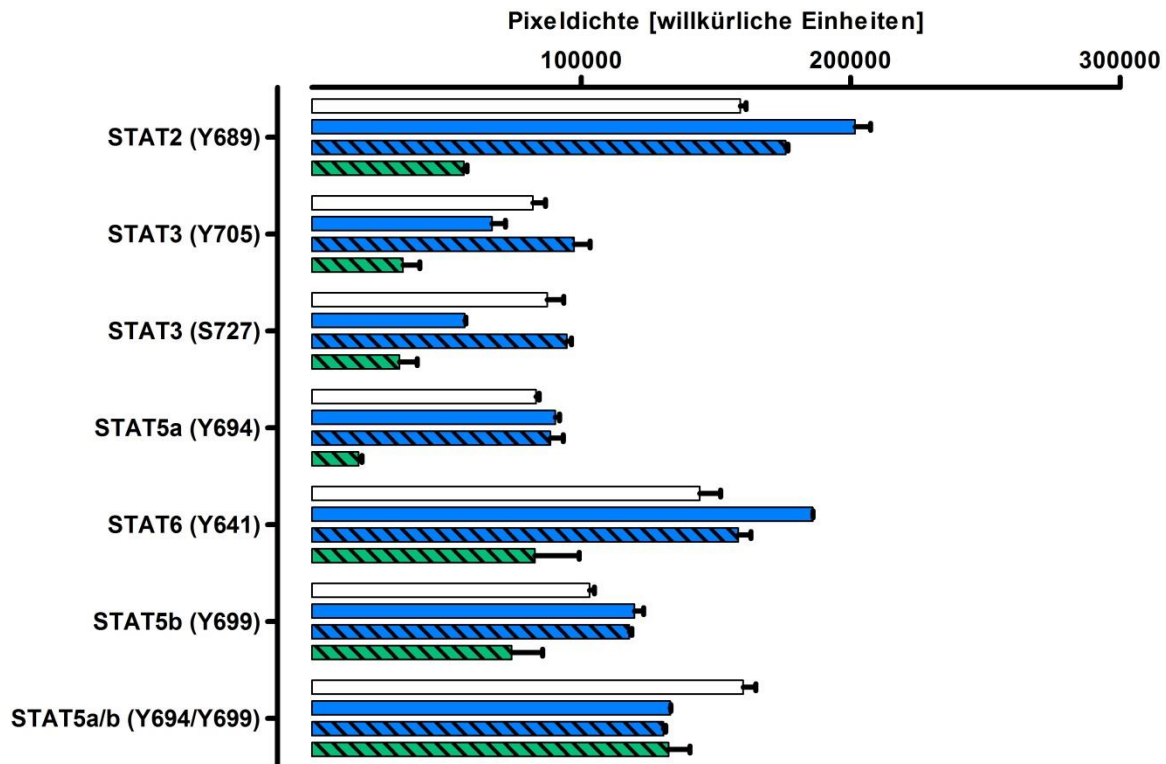


Abbildung 30: Phosphokinasen des STAT-Signalweges; gezeigt sind unbehandelte MCF-7-Zellen (weiß), MCF-7-Zellen auf Kollagen gewachsen ohne MX (blau) und auf Kollagen mit MX [262 nM] (blau/diagonalgestreift), sowie MCF-7-β1-kd auf Kollagen mit MX [262 nM] (grün/diagonalgestreift) nach 72 h Inkubationszeit.

Interessant erscheint vor allem die vermehrte Phosphorylierung von STAT2 und STAT6 unter dem Einfluss einer Kollagenaktivierung. Hinzu kommt, dass in denselben Gruppen die Aktivierung in den MCF-7-β1-kd-Zellen stark reduziert ist. STAT2 aktiviert innerhalb des Nukleus hauptsächlich die Transkription interferonabhängiger Gene (333). STAT6 hingegen ist interleukinabhängig und es konnte in Fibroblasten eine Abhängigkeit der Kollagensynthese vom STAT6-Status gezeigt werden (334). Eine Inkubation mit Kollagen könnte folglich auch einen Einfluss auf die Eigensynthese der Zellen ausüben.

Abbildung 31 zeigt alle weiteren untersuchten Phosphokinasen. Die hohe Expression des *heat shock protein* (HSP), die unter MX-Inkubation zunimmt, ist dabei zu erwarten, da sie als Indikator von zellulärem Stress dient. Ebenfalls interessant ist der Anstieg von WNK1 unter MX. WNK1 spielt eine indirekte Rolle in der Elektrolythomöostase der Zelle und ist eine Ser/Thr-Kinase. In den β1-kd-Zellen auf Kollagen mit MX zeigt sich darüber

hinaus eine erhöhte PRAS40-Aktivität, was auf aktives Akt-*signaling* hindeutet. Diese Aktivierung kann sowohl im Zusammenhang mit PI3K-*signaling*, als auch mit MAPK-*signaling* stehen. Die weiteren Kinasen zeigen keine interessanten Deregulationen und sind nur der Vollständigkeit halber aufgeführt.

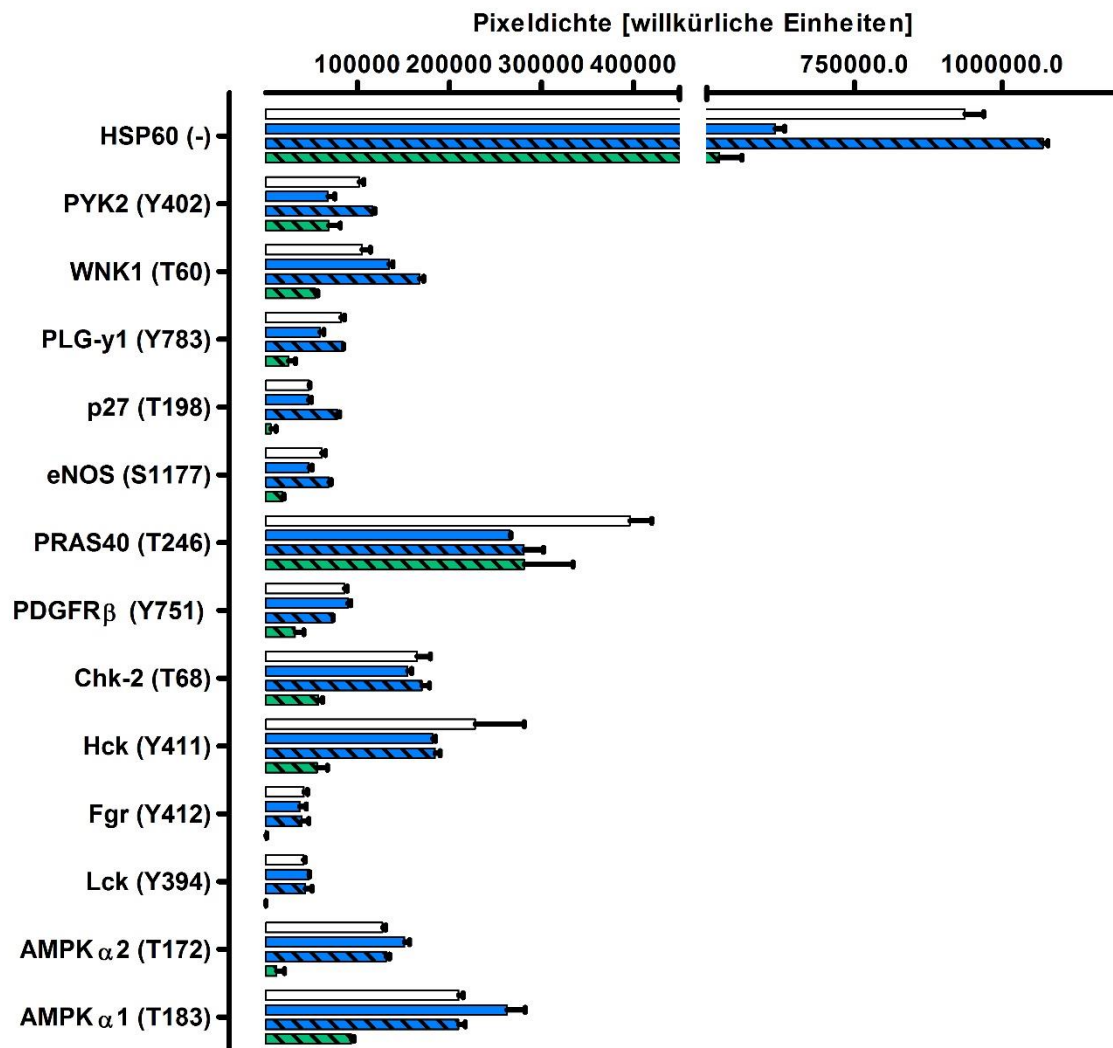


Abbildung 31: Weitere untersuchte Phosphokinasen; gezeigt sind unbehandelte MCF-7-Zellen (weiß), MCF-7-Zellen auf Kollagen gewachsen ohne MX (blau) und auf Kollagen mit MX [262 nM] (blau/diagonalgestreift), sowie MCF-7-β1-kd auf Kollagen mit MX [262 nM] (grün/diagonalgestreift) nach 72 h Inkubationszeit.

5.2.3. Schlussfolgerung

Die Ergebnisse des Screenings geben erste Hinweise auf die Deregulierung dreier wichtiger Signalwege: den Wnt-Signalweg, den PI3K/Akt-Signalweg, und den MAPK-Signalweg. PI3K/Akt als unmittelbar nachgeschalteter Signalweg einer

Integrinaktivierung konnte dabei erwartet werden, während Wnt und MAPK im Kontext der CAM-DR Hinweise auf denkbare neue Mechanismen geben. Die Daten des Arrays werden im Folgenden im Kontext der weiteren Ergebnisse immer wieder aufgegriffen, verstehen sich aber lediglich als Hinweise auf mögliche Zielstrukturen.

5.3. Signalweg 1: Wnt-signaling

5.3.1. Einleitung

Um den Hinweisen des Arrays nachzugehen wurde als eine der am auffälligsten, deregulierten Schlüsselkomponenten die Phosphorylierung der GSK3- β untersucht. Als Zielstruktur der Akt und essentieller Bestandteil des *destruction complexes* innerhalb des kanonischen Wnt-signaling stellt die pGSK3- β eine überaus interessante potentielle Quervernetzung zum klassischen Integrin-signaling dar. Dabei spielen möglicherweise neben der pGSK3- β auch β -Catenin und Axin als Schlüsselproteine des Wnt-Signalweges eine entscheidende Rolle.

5.3.2. Ergebnisse

5.3.2.1. Einfluss der Integrin-Aktivierung auf die Expression von Schlüsselproteinen des Wnt-Signalweges in MCF-7-Mammakarzinomzellen unter dem Einfluss von CDDP und MX

Folglich wurde aufgrund der Ergebnisse des vorangegangenen Screenings (5.2.2.1) der Einfluss einer Zytostatikabehandlung auf die Wnt-Signalkaskade untersucht. Dabei wurden die Zellen sowohl mit CDDP als auch mit MX inkubiert.

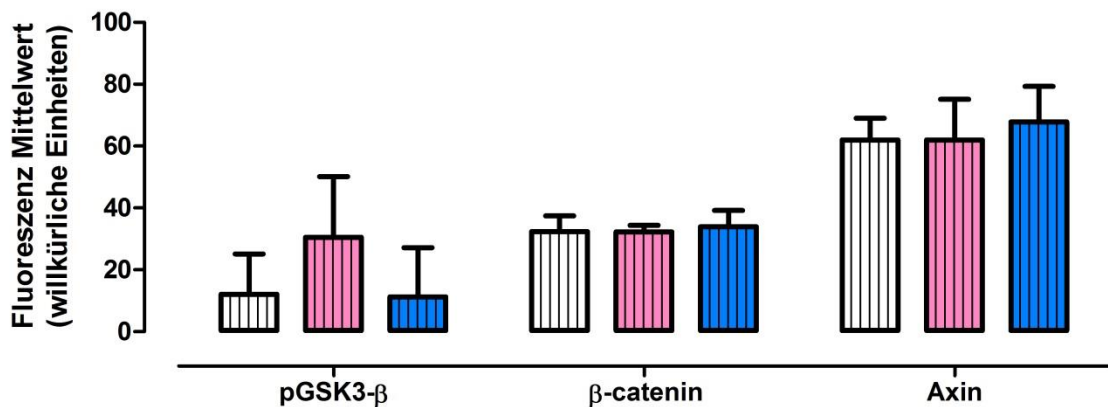


Abbildung 32: Durchflusszytometrische Bestimmung der Schlüsselproteine des Wnt-Signalweges (pGSK3-β, β-Catenin und Axin); gezeigt sind unbehandelte MCF-7-Zellen (weiß), MCF-7-Zellen mit Mn²⁺ [1 mM] vorinkubiert (rosa) und MCF-7-Zellen auf Kollagen gewachsen (blau); Zusatz von CDDP [22 μM] nach 72 h Inkubationszeit.

Betrachtet man die pGSK3-β unter dem Einfluss einer Mn²⁺-induzierten Integrinaktivierung, sieht man in Abbildung 32 einen nicht signifikanten Anstieg der Phosphorylierung. Zwischen den unbehandelten und kollageninkubierten Zellen findet sich wiederum kein Unterschied. β-Catenin hingegen zeigt über alle drei untersuchten Behandlungen eine unverändert gleichmäßige Expression. Dieselbe Aussage kann auch für Axin1 getroffen werden.

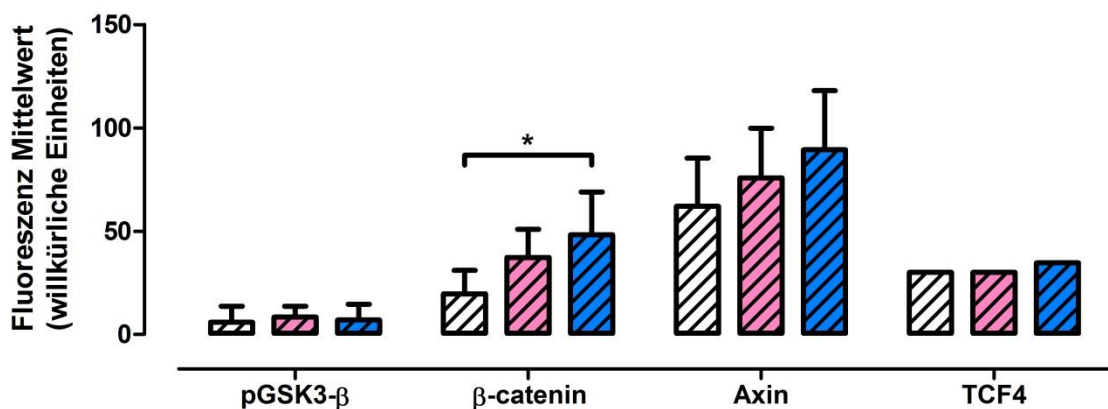


Abbildung 33: Durchflusszytometrische Bestimmung der Schlüsselproteine des Wnt-Signalweges (pGSK3-β, β-Catenin und Axin); gezeigt sind unbehandelte MCF-7-Zellen (weiß), MCF-7-Zellen mit Mn²⁺ [1 mM] vorinkubiert (rosa) und MCF-7-Zellen auf Kollagen gewachsen (blau); Zusatz von MX [262 nM].

Für die Behandlung mit MX sieht man für die pGSK3-β in allen drei untersuchten Populationen Expressionslevel auf gleichem Niveau. Die Expression von β-Catenin hingegen steigt unter Mn²⁺ leicht und unter Kollagen signifikant an. Für Axin zeigt sich

die gleiche Tendenz, allerdings ohne einen signifikanten Unterschied. TCF4 als nukleärer Bindungspartner des β -Catenin wurde in einer Einzelmessung untersucht ($n = 1$). Da eine statistische Auswertung somit entfällt, sei an dieser Stelle nur darauf hingewiesen, dass sich kein Unterschied in den drei Behandlungsgruppen zeigte.

Um die interessanten Erkenntnisse der mit MX behandelten MCF-7-Zellen näher zu untersuchen, wurde zusätzlich die Expression von β -Catenin mittels Westernblot getestet. Neben der Gesamtexpression wurde auch die Lokalisation innerhalb der Zelle berücksichtigt, da diese als Folge einer Aktivierung alternieren kann. Somit zeigt Abbildung 59 sowohl die β -Catenin-Gesamtexpression, als auch die Aufteilung in zytosolische und nukleäre Fraktion. Zusätzlich sind zwei *housekeeping* Proteine angegeben, GAPDH als zytosolischer Marker und LaminB1, ein Bestandteil der nukleären Membran, als nukleärer Marker. Darüber hinaus wird die β -Catenin-Gesamtexpression (Nukleus und Zytosol) mittels Pixeldichtenanalyse dargestellt.

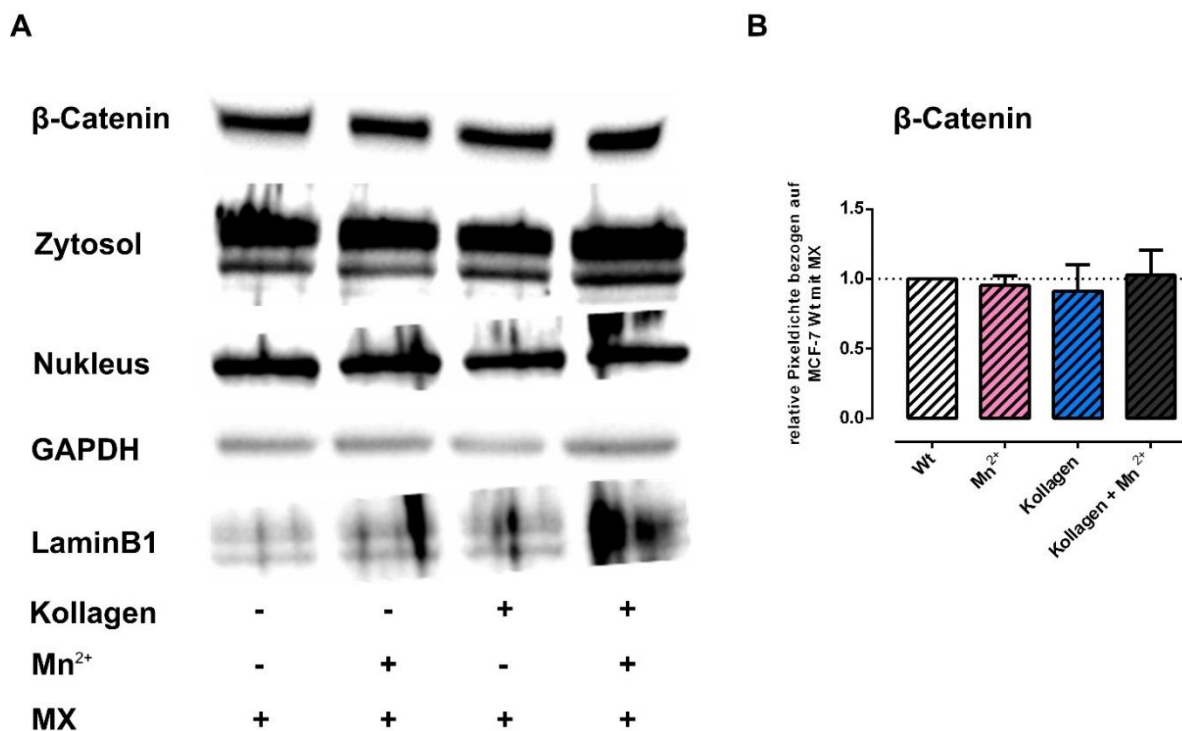


Abbildung 34: A) Westernblot von β -Catenin nach der Behandlung der MCF-7-Zellen mit MX [262 nM] mit Mn²⁺ [1 mM], Kollagen und der Kombination beider Behandlungen nach 72 h Inkubationszeit; gezeigt ist die Gesamtexpression (β -Catenin) und die Verteilung in zytosolischer (Zytosol) und nukleärer (Nukleus) Fraktion B) Pixeldichtenanalyse des Gesamt- β -Catenin aus A von MCF-7-Zellen unbehandelt (weiß), mit Mn²⁺ [1 mM] (rosa), Kollagen (blau) und der Kombination (schwarz) behandelt und mit MX [262 nM] versetzt nach 72 h Inkubationszeit.

Die Lamin-B1-*housekeeping*-Kontrolle weist in einem größeren Maße unspezifische Bindungen auf, ist aber innerhalb der untersuchten Behandlungen uniform was eine Aussage zur nukleären Fraktion des Lysats zulässt. GAPDH bestätigt den gleichen Sachverhalt innerhalb der zytosolischen Fraktion. Somit beeinflusst weder eine Inkubation mit Mn^{2+} , noch mit Kollagen die Expression von β -Catenin in den beiden Fraktionen. Dieses Ergebnis bestätigt sich ebenfalls für die Kombination aus Kollagen und Mn^{2+} . Die Hochregulierung von β -Catenin bei MCF-7-Zellen auf Kollagen kultiviert, wie man sie am Durchflusszytometer sehen konnte, bestätigt sich somit nicht im Westernblot-Experiment.

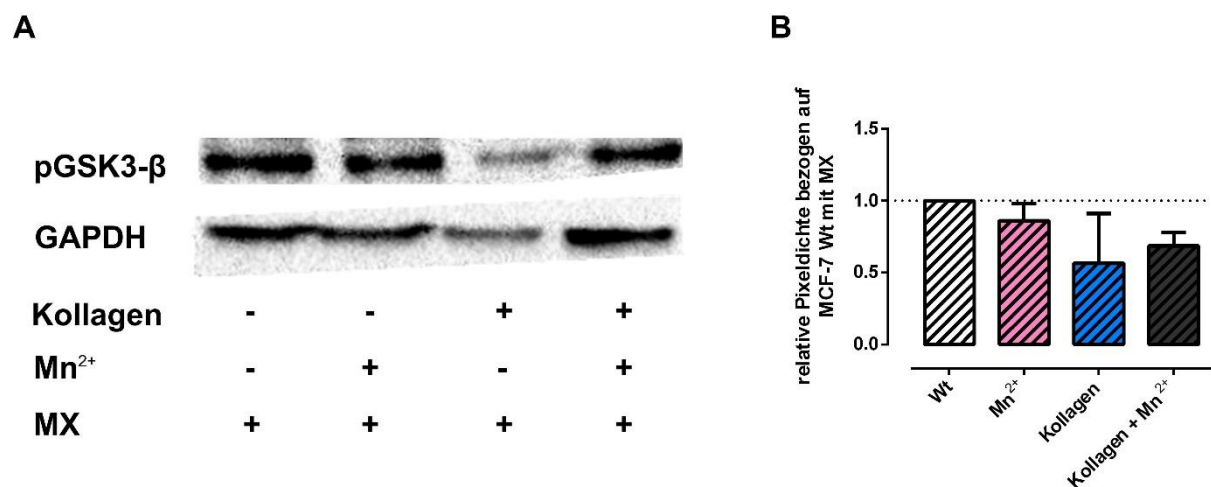


Abbildung 35: A) Westernblot der pGSK3- β nach der Behandlung der MCF-7-Zellen mit MX [262 nM] mit Mn^{2+} [1 mM], Kollagen und der Kombination beider Behandlungen nach 72 h Inkubationszeit B) Pixeldichten Analyse der Westernblots aus A MCF-7-Zellen unbehandelt (weiß), mit Mn^{2+} [1 mM] (rosa), Kollagen (blau) und der Kombination (schwarz) behandelt und mit MX [262 nM] versetzt.

Die Betrachtung der pGSK3- β im Westernblot (Abbildung 35) stimmt überein mit der Messung am Durchflusszytometer. Für keine der untersuchten Behandlungen zeigt sich eine Erhöhung der pGSK3- β -Level gegenüber dem Ausgangsniveau der Wt-Zellen. Die Messung der pGSK3- β -Level auf Kollagen ist durch den Ausschluss eines Ausreißers nur als $n = 2$ gezeigt, sie ist aber tendenziell erniedrigt.

5.3.2.2. Einfluss unterschiedlicher Integrin-Aktivierungen auf die Aktivität des Wnt-Signalweges in MCF-7-Mammakarzinomzellen

Aufgrund der teils unterschiedlichen Aussagen wurde als abschließende Untersuchung des Wnt-Signalweges die Aktivität des Wnt-Signalweges in MCF-7-Zellen abgebildet. Die Zellen wurden dafür mit einem TCF/LEF-Reporterplasmid transient transfiziert und im *TOPflash-Assay* vermessen. Dabei bildet das Reporterplasmid *firefly luciferase* in Abhängigkeit von der Aktivität des Signalweges ein detektierbares Lumineszenzsignal. Gleichzeitig wird zusätzlich die konstitutiv exprimierte *renilla luciferase* vermessen und die *firefly*-Lumineszenz auf diese normalisiert (siehe 4.6.5). Abbildung 36 zeigt die auf die *renilla luciferase* normalisierten absoluten Lumineszenzwerte aller vermessenen Behandlungen inklusive der Werte für die Positiv- und Negativkontrolle des Assays.

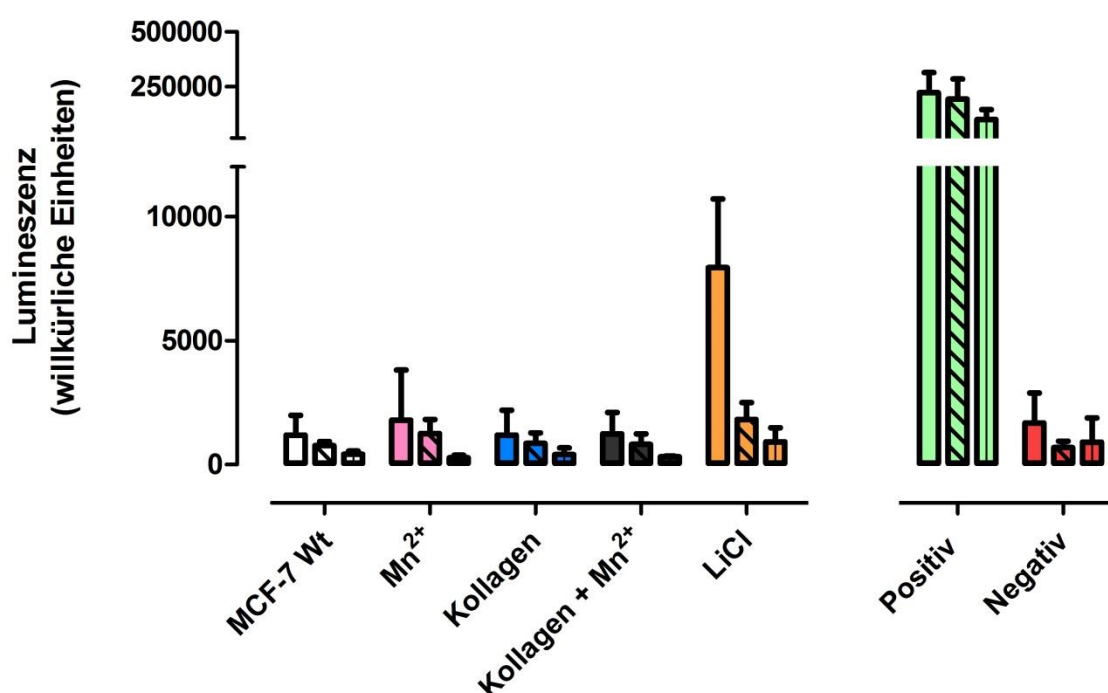


Abbildung 36: TOPflash-Assay in MCF-7-Zellen; gezeigt ist die Lumineszenz unbehandelter (weiß) MCF-7-Zellen (MCF-7-Wt), mit Mn²⁺ [1 mM] vorinkubiert (rosa), auf Kollagen kultiviert (blau) oder Kollagen plus Mn²⁺ (schwarz); zusätzlich LiCl [50 mM] (orange) als Wnt-Aktivator. Die assayinternen Positiv- (hellgrün) und Negativkontrollen (rot) sind ebenfalls abgebildet. Neben den unbehandelten Ansätzen (ohne Muster) wurden die Zellen für 72 h mit MX [262 nM] (diagonalgestreift) und CDDP [22 µM] (längsgestreift) inkubiert.

Die sehr starken Lumineszenzwerte der Positivkontrolle zeigen die erfolgreiche Transfektion der Zellen, während die geringen Werte der Negativkontrolle den Einfluss des Transfektionsvorgangs bzw. eine Nullaktivität in den Zellen abbilden.

Die MCF-7-Zellen wurden mit den integrinaktivierenden Stimuli Kollagen und Mn^{2+} , sowie deren Kombination versetzt. Zusätzlich wurde LiCl als Wnt-Aktivator vermessen. In den MCF-7-Zellen ohne Zytostatikabehandlung wird durch LiCl ein starker Lumineszenzanstieg verursacht, verglichen mit der geringen Grundaktivität in unbehandelten MCF-7-Zellen (weiß/ohne Muster). Unter der Behandlung mit MX ist lediglich ein leichter Anstieg zu verzeichnen und unter CDDP ist die Aktivierung der Zellen offenbar nicht mehr möglich. In den MCF-7-Zellen ohne Zytostatikazusatz ist lediglich in der Mn^{2+} - (rosa/ohne Muster) behandelten Population eine tendenzielle Zunahme der Lumineszenz zu verzeichnen. Kollagen (blau/ohne Muster) und die Kombinationsbehandlung (schwarz/ohne Muster) bleiben auf dem Ausgangsniveau (weiß/ohne Muster). Betrachtet man nun Mn^{2+} , Kollagen (blau) und Kollagen plus Mn^{2+} (schwarz) unter CDDP- (längsgestreift) Einfluss, so sieht man, dass unter allen Behandlungen sehr niedrige Werte entstehen, die auf dem Level der Messwerte der Negativkontrolle liegen. Sie sind somit nur bedingt aussagekräftig, decken sich aber mit der LiCl-Messung. Für die Behandlung mit MX (diagonalgestreift) sind analog zu der Behandlung mit CDDP keine Unterschiede gegenüber der unbehandelten Kontrolle (weiß/diagonalgestreift) messbar. Lediglich für die Mn^{2+} -Behandlung zeichnet sich wie schon in den Zellen ohne Zytostatika (weiß/ohne Muster) ein geringer Anstieg der Lumineszenz ab. Um auch eine Aussage über einen denkbaren Einfluss EMT-vermittelter Prozesse zuzulassen, wurde abschließend die Expression von E-Cadherin untersucht. In der Literatur ist E-Cadherin als potentieller EMT-Marker und β -Catenin-Bindungspartner beschrieben.

5.3.2.3. Einfluss der Integrin-Aktivierung auf die Expression von E-Cadherin in MCF-7-Mammakarzinomzellen unter dem Einfluss von CDDP und MX

Schaut man sich nun zuerst die Daten der mit CDDP versetzten Zellen unter Kollagen an (Abbildung 37 längsgestreift), so ist eine hochsignifikante Zunahme des gesamten zellulären E-Cadherins sichtbar. Die Ergebnisse der Mn^{2+} -Behandlung sind nicht von den unbehandelten Zellen zu unterscheiden. Auf eine Untersuchung mittels Westernblot wurde an dieser Stelle verzichtet.

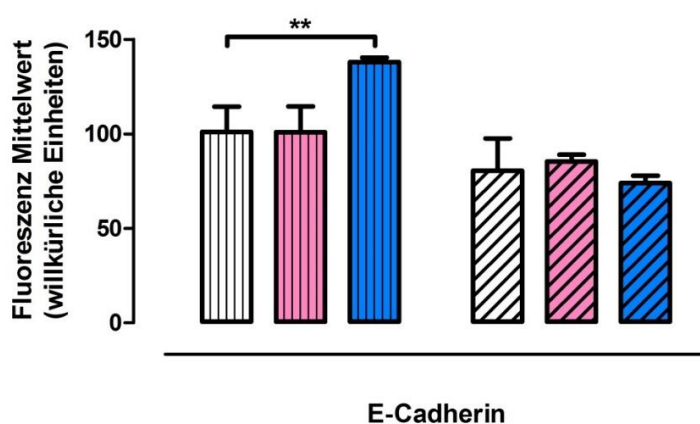


Abbildung 37: Durchflusszytometrische Bestimmung von E-Cadherin; gezeigt sind unbehandelte MCF-7-Zellen (weiß), MCF-7-Zellen mit Mn^{2+} vorinkubiert (rosa) und MCF-7-Zellen auf Kollagen gewachsen (blau); Zusatz von CDDP [22 μ M] (längsgestreift) und Zusatz von MX [262 nM] (diagonalgestreift) nach 72 h Inkubationszeit.

Die gleichen Untersuchungen wurden auch an MCF-7-Zellen mit MX-Behandlung durchgeführt. Die Messungen auf Kollagen wurden lediglich als $n = 2$ vermessen. Für E-Cadherin lässt sich hier kein Unterschied zwischen den drei Behandlungsgruppen zeigen.

5.3.3. Schlussfolgerungen

Betrachtet man die Ergebnisse der Wnt-Untersuchungen, hilft es zur besseren Einordnung eine aktuelle Studie an Brustkrebszelllinien hinzuzuziehen. In dieser Studie konnte für MCF-7- und MDA-MB-231-Brustkrebszellen gezeigt werden, dass eine Inhibition der FAK zu einer Deregulation von β -Catenin führt. Dabei wurde sowohl die direkte Phosphorylierung von β -Catenin an Tyr 654 durch die FAK, als auch die inhibitorische Beeinflussung der Akt und der GSK3- β als verantwortlicher Mechanismus identifiziert

(335). Eine Übertragung dieses Mechanismus auf die CAM-DR nach Betrachtung des Screenings erscheint somit vielversprechend.

Allerdings zeigen sowohl die durchflusszytometrischen als auch die Westernblot-Untersuchungen in den MCF-7-Zellen keine Veränderungen der β -Catenin-Expression oder Lokalisation auf. Lediglich in der durchflusszytometrischen Untersuchung der β -Catenin-Expression der Zellen auf Kollagen mit MX-Behandlung, zeigte sich ein signifikanter Anstieg der β -Catenin-Level. Allerdings ließ dieser sich nicht im selben Umfang im Westernblot-Experiment bestätigen. Da sich in den weiteren Ergebnissen keine Anhaltspunkte für eine Wnt-Aktivität in den MCF-7-Zellen ergeben, ist diese Diskrepanz in der Interpretation der Ergebnisse nicht weiter relevant und wurde nicht näher untersucht. Auch in der pGSK3- β -Expression wurden keine signifikanten Unterschiede sichtbar und die Ergänzung um TCF4 erbrachte ebenfalls keine weiteren Hinweise auf aktives Wnt-*signaling*. Die Messungen auf Aktivitätsebene, durch die transiente Transfektion der MCF-7-Zellen mit einem TCF/LEF-Reporterkonstrukt, bestätigten schlussendlich die vorrangegangenen Untersuchungen darin, dass die Integrin-vermittelte Resistenzbildung in MCF-7-Zellen nicht über eine Quervernetzung von Wnt- und PI3K/Akt-*signaling* stattfindet. Dabei diente LiCl als Positivkontrolle für die Aktivierung klassischen Wnt-*signalings*. Die Aktivierung verläuft über eine Hemmung der GSK3- β , unabhängig von Ser 9, und demonstriert die grundsätzliche Kapazität der Zellen, Wnt-*signaling* über den klassischen Signalweg anzusteuern. Interessanterweise konnte die Aktivierung in den unbehandelten MCF-7-Zellen induziert werden, während mit CDDP oder MX behandelte Zellen nicht dazu in der Lage waren, Wnt-gesteuerte Genabschnitte zu aktivieren. Auch alle weiteren Behandlungsgruppen zeigten keine Aktivität. Die hohe Sensitivität gegenüber den Zytostatika und das damit verbundene Ausbleiben eines Reportersignals lassen darauf schließen, dass Wnt-*signaling* nicht im Zusammenhang mit einer integrinvermittelten Resistenzbildung in MCF-7-Zellen steht.

An dieser Stelle sollen allerdings zwei wichtige Erkenntnisse aus diesem experimentellen Setting besprochen werden, die für die Interpretation der weiteren Daten von Relevanz sind. Zum einen wurde an den MCF-7-Zellen, wann immer es vielversprechend erschien, nicht nur das Anthracendion MX als Zytostatikum eingesetzt, sondern auch das platinbasierte CDDP. Dies sollte dabei helfen, den Integrin vermittelten CAM-DR

Mechanismus unter unterschiedlich wirkenden Zytostatika zu vergleichen. Da die Zellen auf geringere Konzentration von MX als von CDDP ansprechen (Faktor 100), wurde vorwiegend MX als Zytostatikum eingesetzt. Die Struktur des MX bedingt dabei auch die zweite wichtige Erkenntnis: In den Mn^{2+} -Behandlungsgruppen, bei gleichzeitiger MX Behandlung, ist eine leicht verringerte Wirksamkeit des Zytostatikums möglich. Da zweiwertige Kationen Anthrazykline (starke strukturelle Ähnlichkeit zu MX) zumindest partiell komplexieren können (336), kann es trotz des Austausches des Mangan haltigen Mediums vor dem Inkubationsstart mit MX durch die geringe freie Restkonzentration an Mangan zu einer verminderten MX-Konzentration kommen. Dies fällt vor allem bei empfindlichen Messmethoden wie dem MTT-Assay auf. Für CDDP sind soweit bekannt keine dieser Wechselwirkungen beschrieben.

5.4. Signalweg 2: FAK/PI3K/Akt-signaling

5.4.1. Einleitung

Da in den MCF-7-Zellen keine Wnt-Aktivität festgestellt werden konnte, wurde dem zweiten Hinweis des Proteome Profiler Array nachgegangen (5.2.2.2) und eine erste Betrachtung des dem Integrin unmittelbar nachgeschalteten *signalings* vorgenommen. Wie im Screening bereits zu sehen war, ist eine Kollagen-Stimulierung der Zellen für eine erhöhte FAK-Phosphorylierung an Tyr 397 verantwortlich. Des Weiteren ist die FAK mit nahezu den höchsten Signalen aller untersuchten Kinasen vertreten. Die PI3K, als eine der direkt nachgeschalteten Zielstrukturen der Integrine, wird nicht vom Array erfasst. Dafür ist interessanterweise die Phosphorylierung der Akt an Thr 308 gesteigert, was auf eine durch die PI3K vermittelte Aktivitätserhöhung hindeutet, da diese direkt, oder über PDK1 die Akt an Thr 308 phosphoryliert. Die weitere Phosphorylierung an Ser 473 erfolgt üblicherweise durch mTOR, welches ebenfalls erhöht war, ohne dass sich die Aktivierung bereits auf die Akt-Phosphorylierungsstelle übertragen hätte. Diese gesteigerte Phosphorylierung könnte auch die Erhöhung an pGSK3- β als Akt-Zielstruktur erklären, separiert vom Wnt-Signalweg. Darüber hinaus war die Phosphorylierung der p70s6Kinase erhöht, die als nachgeschaltetes Ziel der PI3K und mTOR ebenfalls auf eine Steigerung des Integrin-*signalings* hindeutet. Um diesen Hinweisen weiter nachzugehen, wurde in vorangegangenen Arbeiten die klassische Signalkaskade mittels Inhibitoren an

verschiedenen Schnittstellen unterbrochen und die Auswirkung auf das Resistenzverhalten der MCF-7-Zellen untersucht.

Wir konnten dabei zeigen, dass die klassische FAK/PI3K/Akt-Signalkaskade in MCF-7-Zellen aktiv ist und dass über eine gezielte Inhibition der FAK und PI3K die Resistenzbildung nivelliert und Zellen zusätzlich sensitiviert werden konnten (332).

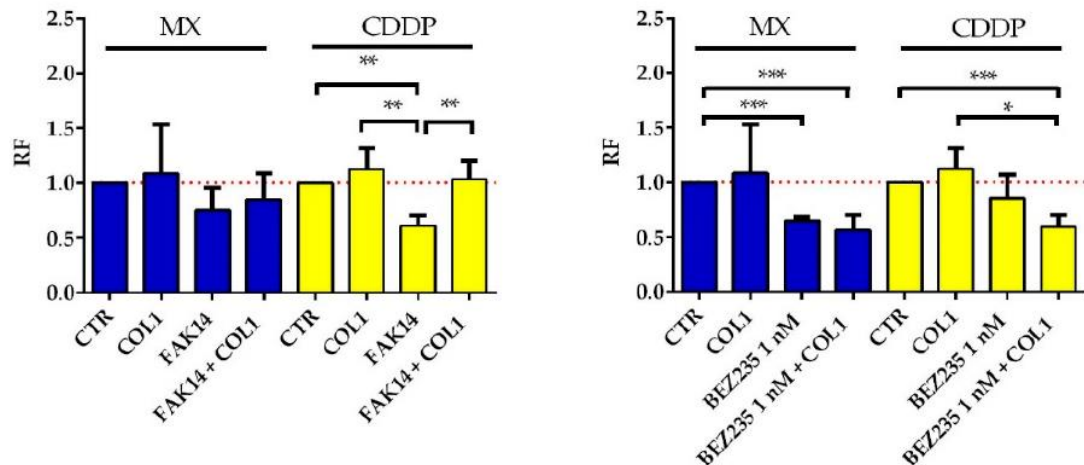


Abbildung 38: Inhibition der FAK und PI3K in MCF-7-Zellen mittels FAK14 [1 µM] und BEZ235 [1 nM]. Gezeigt sind in Blau die mit MX [262 nM] inkubierten Zellen ohne Zusätze (CTR), auf Kollagen gewachsen (COL1), mit FAK Inhibitor (FAK14), mit FAK Inhibitor auf Kollagen (FAK14 + COL1), mit PI3K Inhibitor (BEZ235 1 nM) und mit PI3K Inhibitor auf Kollagen (BEZ235 1 nM + COL1). In Gelb sind die analogen Zusätze unter CDDP [22 µM] gezeigt. Die Daten wurden freundlicherweise von Herrn Fabian Baltes zur Verfügung gestellt und modifiziert nach Jakubzig et al. (332).

Abbildung 38 veranschaulicht die Inhibition der FAK an der Autophosphorylierungsstelle Tyr 397 durch den „FAK Inhibitor 14“, welcher die MCF-7-Zellen in Anwesenheit von MX leicht sensitiviert, und dass Kollagen diesen Effekt gegen kompensiert. Unter dem Einfluss von CDDP wird dieser Effekt deutlich klarer, da hier mit dem FAK Inhibitor eine signifikante Sensitivierung erzielt wird, die durch Kollagen vollständig nivelliert werden kann. Dieser Effekt lässt sich über eine ECM vermittelte Integrin-Aktivierung begründen, welche die Phosphorylierung der FAK vermutlich so stark steigert, dass eine Inhibierung in für die Zelle verträglichen physiologischen Inhibitor Konzentrationen nicht mehr zur Blockade der FAK Aktivierung ausreicht. Die Inhibierung der PI3K über BEZ235 zeigte unter beiden Zytostatika eine starke Sensitivierung auf Kollagen. Da die PI3K als konsequente Zielstruktur der FAK fungiert, ist eine FAK Aktivierung oft auch mit einer vermehrten PI3K Aktivierung verbunden. Interessanterweise kann aber die

Inkubation mit Kollagen die Sensitivierung nicht aufheben, wie es bei der FAK der Fall war. Dies könnte daran liegen, dass die PI3K als *downstream* Zielstruktur noch durch weitere Signalwege beeinflusst werden kann, oder dass die Inhibierung durch BEZ235 umfassender ausfällt, bzw. der durch die FAK generierte Pool an pPI3K geringer ausfällt, als der der *upstream* Komponente FAK selbst. Dies erscheint vor allem dann logisch, wenn man sich vor Augen führt, dass die Aktivierung einer Signalkaskade in Analogie zu einem Wasserfall funktioniert. Es kann am Schluss nie mehr Wasser herausfließen, als initial hineingeflossen ist, und durch zahlreiche Verzweigungen verteilt sich das Wasser innerhalb des Wasserfalls, bevor es am Ende wieder hinausströmt.

Die sich logisch anschließende Frage ist folglich, was passiert, wenn man den Zellen einen ihrer Hauptbindungspartner für die Kollagen-Bindung entzieht? Um diesen Vorgang im Modell zugänglich zu machen, wurden die MCF-7-Zelllinie transduziert und mittels shRNA ein $\beta 1$ -*knock-down* (MCF-7- $\beta 1$ -kd) induziert. Zusätzlich wurde eine Kontrollzelllinie transduziert, die nonsens shRNA produziert und somit die Eigenschaften normaler MCF-7-Zellen beibehalten sollte.

5.4.2. Ergebnisse

Etablierung und Untersuchung einer MCF-7 $\beta 1$ -kd-Zelllinie

Die MCF-7- $\beta 1$ -kd-Zellen wurden durch Transfektion mittels eines lentiviralen Vektors erzeugt und im Anschluss über ihre morphologischen Unterschiede (5.4.2.1) zur ursprünglichen MCF-7-Zelllinie und bezüglich ihrem Ansprechen gegenüber der Behandlung mit CDDP und MX (5.4.2.2) charakterisiert. Die Zellen wurden ebenfalls mit Kollagen (5.4.2.3), Mn^{2+} (5.4.2.4) und dem „FAK Inhibitor 14“ (5.4.2.5) behandelt um die zuvor aufgeworfene Frage nach dem Einfluss einer $\beta 1$ -Verarmung auf die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges zu untersuchen.

5.4.2.1. Morphologische Unterschiede der MCF-7- β 1-kd-Zellen im Vergleich mit MCF-7-sc-Zellen kultiviert auf Kollagen

Die MCF-7-sc aus Abbildung 39 zeigen ein charakteristisches Wachstumsverhalten für Zellen epithelialen Ursprungs.

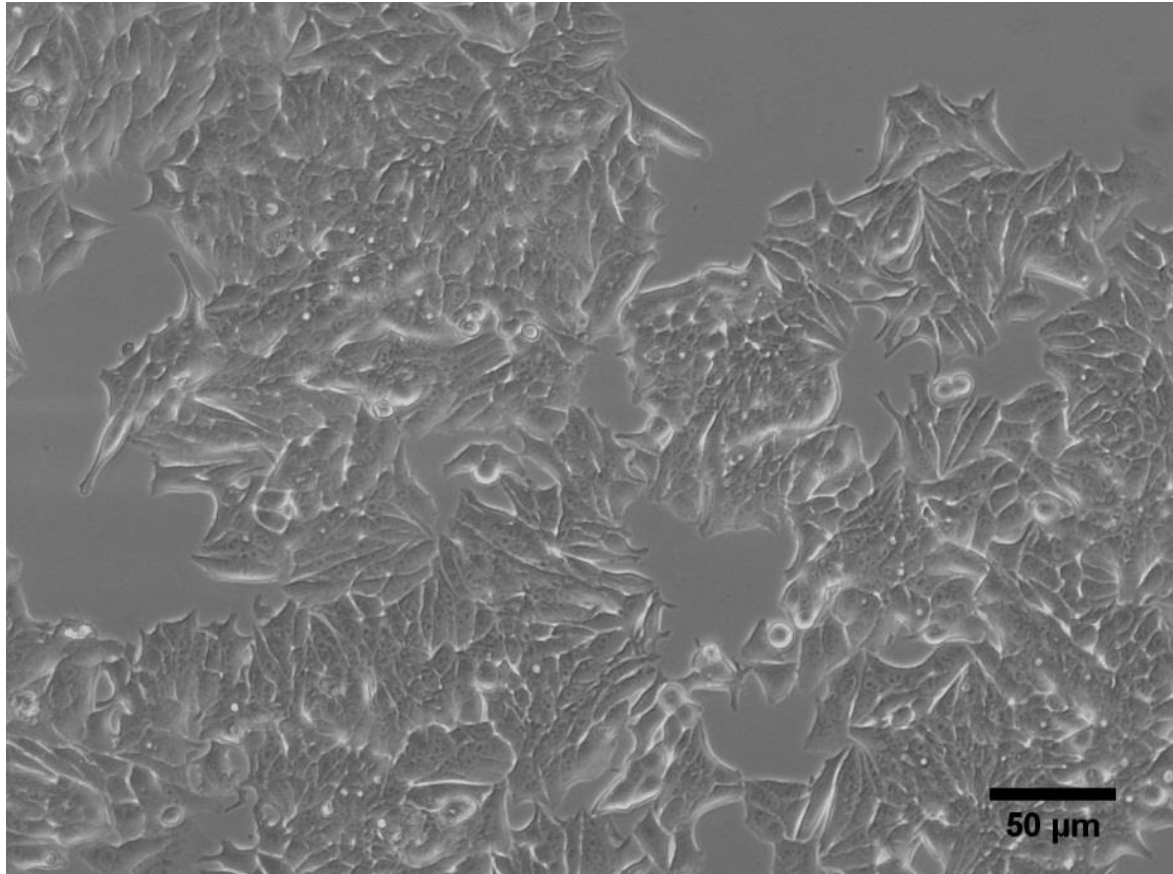


Abbildung 39: MCF-7-sc auf Kollagen Typ I nach 72 h Inkubationszeit.

Sie wachsen in flachen Zellverbänden, deren Zellen eine längliche Spreitung aufweisen. Dies deutet auf die Funktionalität der β 1-Integrine hin. Die Zellen wachsen dabei über die gesamte, ihnen zur Verfügung stehende Fläche der Zellkulturflasche bis zum Erreichen der Konfluenz. Der Anteil an überlappenden Zellverbänden ist gering. Betrachtet man nun im Gegensatz dazu die MCF-7- β 1-kd-Zellen, so zeigt sich eine stark veränderte Morphologie. Die Zellen wachsen vorwiegend in Clustern zusammen und dabei auch vermehrt übereinander, wodurch sie dreidimensionale Strukturen formen. Sie wirken weniger stark gespreitet als die MCF-7-sc-Zellen, vielmehr sind sie leicht abgerundet. Durch die Clusterbildung verlieren die MCF-7- β 1-kd-Zellen darüber hinaus die Haftung

zum Untergrund und stabilisieren sich über die vermehrt ausgebildeten Zell-Zell-Kontakte (Abbildung 40).

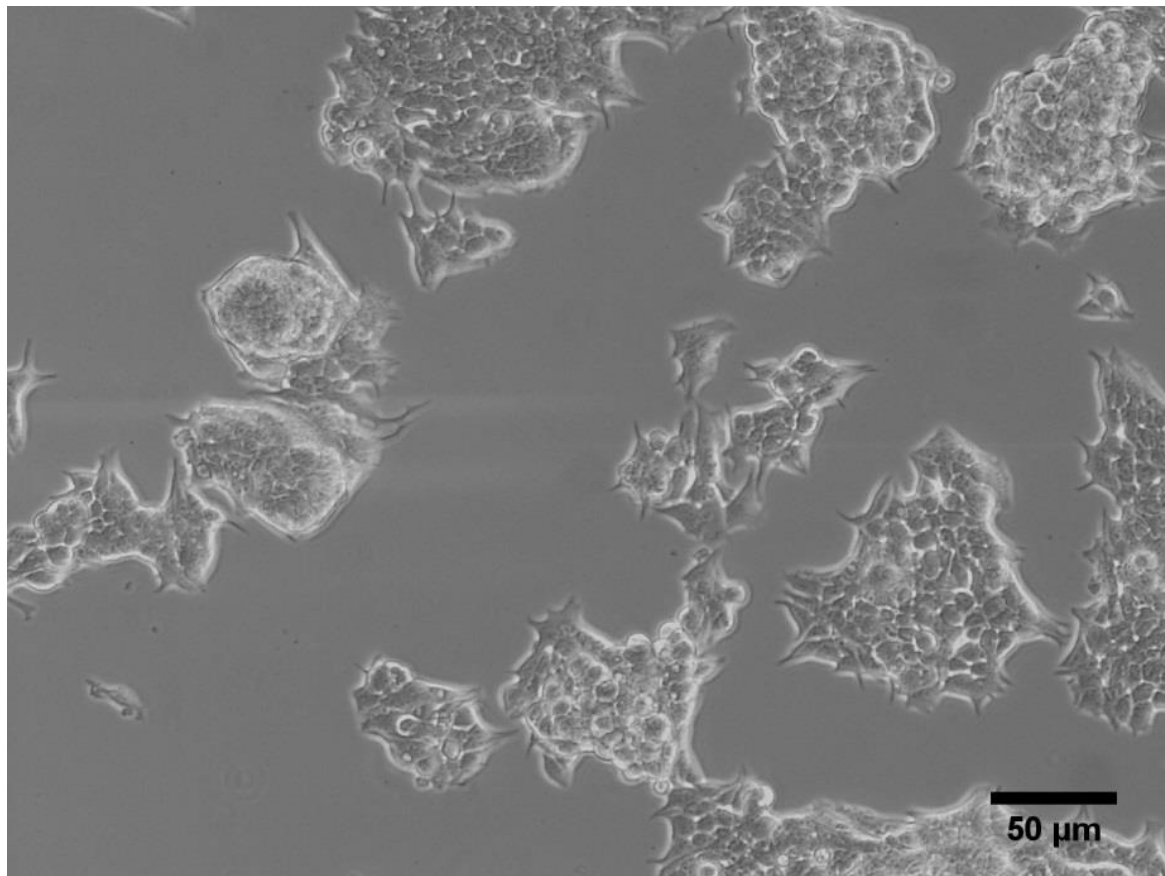


Abbildung 40: MCF-7- β 1-kd-Zellen auf Kollagen Typ I nach 72 h Inkubationszeit.

Betrachtet man nun die *knock-down* Effizienz im Westernblot-Experiment wie in Abbildung 41 gezeigt, erkennt man, dass in den MCF-7-sc-Zellen größere Mengen des β 1 Integrins zu finden sind. Dies gilt für die transfizierten Zellen beider Ansätze, die somit als äquivalent angesehen werden können. Die MCF-7- β 1-kd-Zellen hingegen zeigen kaum detektierbare β 1-Integrin-Level.

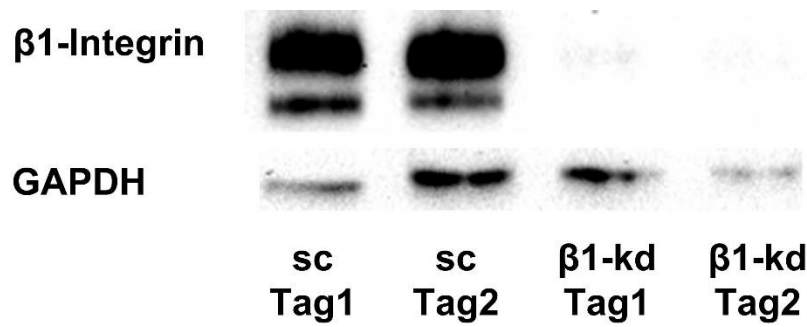


Abbildung 41: Westernblot des β 1-Integrins in MCF-7-sc und MCF-7- β 1-kd transfiziert an Tag 1 und an Tag 2.

Die Pixeldichtenanalyse des Westernblot aus Abbildung 41 zeigt repräsentativ für Tag 1 die Downregulierung der β 1-Untereinheit. Sie liegt bei ca. 14 % des Ausgangswertes und erweist sich als hoch effektiv.

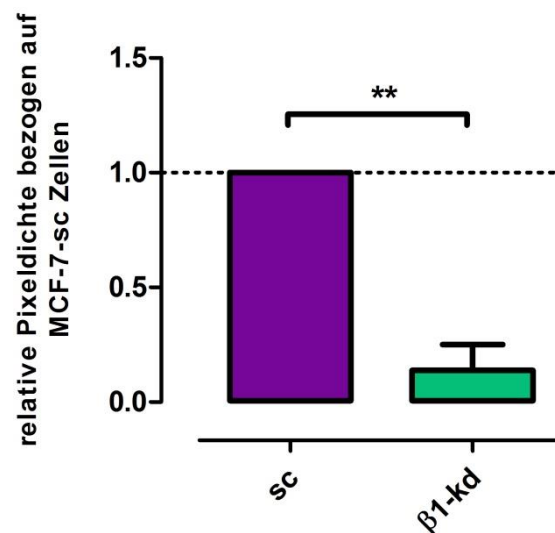


Abbildung 42: Pixeldichten Analyse des Westernblots aus Abbildung 41 in MCF-7-sc- und MCF-7- β 1-kd-Zellen von Tag 1.

5.4.2.2. Auswirkung des *knock-down* der β 1-Untereinheit auf die Chemoresistenz von MCF-7-Mammakarzinomzellen

In den folgenden Abschnitten werden die Daten der MTT-Zytotoxizitätsassays gezeigt, die dazu verwendet wurden, den Einfluss des β 1-*knock-down* auf die integrinvermittelte Resistenzbildung zu untersuchen.

Tabelle 8: Übersicht der Zytotoxizität der verwendeten Zytostatika CDDP und MX mit 2000 Zellen über 72 h Inkubationszeitraum und die daraus resultierenden Resistenzfaktoren.

		MCF-7-sc			MCF7-β1-kd			
Zytostatikum	Inkubations- ansatz	pIC50		IC50 [μmol/L]	pIC50		IC50 [μmol/L]	RF
		MW	STABW		MW	STABW		
Cisplatin	Ø	4,35	0,19	45,2	4,53	0,08	29,4	0,65
Mitoxantron	Ø	6,60	0,42	0,25	6,87	0,37	0,14	0,54

Tabelle 8 bietet eine Übersicht über die Zytotoxizität der in dieser Arbeit verwendeten Zytostatika CDDP und MX, bezogen auf die zuvor erzeugten Zelllinien MCF-7-sc und MCF-7-β1-kd. Die Tabelle gibt Auskunft über die aus den gemittelten pIC₅₀-Werten rückgerechneten IC₅₀-Werten und den daraus resultierenden RF-Wert. Der RF-Wert vergleicht hier die Zytotoxizitäten der Wirkstoffe in den MCF-7-β1-kd-Zellen mit denen der MCF-7-sc-Zellen. Ein reduzierter RF-Wert, wie er sich für beide Zytostatika zeigt, bedeutet, dass MCF-7-β1-kd-Zellen sensibler gegenüber dem Zytostatikum reagieren als ihre Kontrollgruppe, die MCF-7-sc-Zellen.

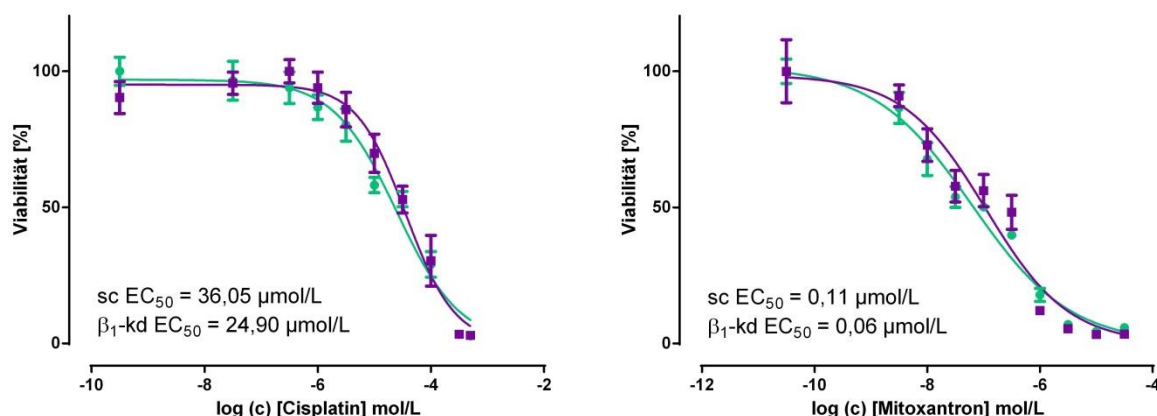


Abbildung 43: Exemplarische Messung der Zytotoxizität von CDDP und MX mit 2000 Zellen über 72 h Inkubationszeit im Vergleich MCF-7-sc- (lila) und MCF-7-β1-kd-Zellen (grün).

Abbildung 43 zeigt diesen Befund exemplarisch als eine Messung mindestens dreier Wiederholungen. Abbildung 44 hingegen stellt den Mittelwert der RF-Werte aller Einzelmessungen nach Normalisierung dar. Hierfür wurden die MCF-7-sc als 1,0 bzw. 100 % betrachtet und alle MCF-7-β1-kd im Verhältnis dazu auftragen und statistisch ausgewertet. Folglich repräsentiert diese Darstellung die relativen Verhältnisse zwischen den beiden Zelllinien (Tabelle 8 hingegen zeigt die absoluten Verhältnisse). Es ergibt sich ein statistisch signifikant niedrigerer normalisierter RF-Wert für die MCF-7-β1-kd-Zellen

unter der Behandlung mit MX. Die Behandlung mit CDDP zeigt keine statistische Signifikanz.

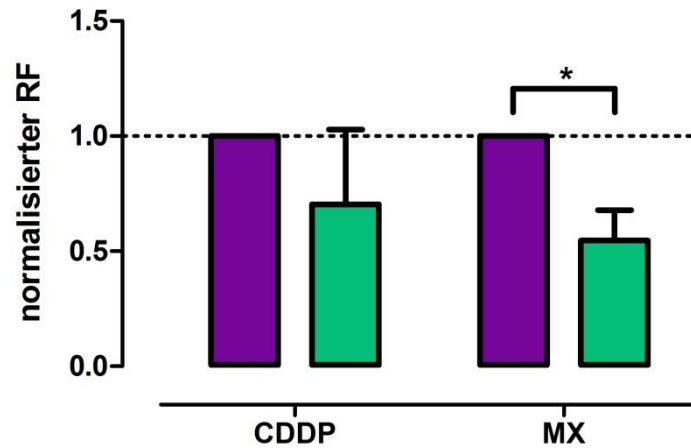


Abbildung 44: Graph der Zytotoxizität von CDDP und MX mit 2000 Zellen über 72 h Inkubationszeit. Dargestellt sind die gemittelten RF-Werte der in Abbildung 43 exemplarisch gezeigten Replikate, normalisiert auf die MCF-7-sc-Zellen.

5.4.2.3. Auswirkung des *knock-down* der β 1-Untereinheit auf die Chemoresistenz von MCF-7-Mammakarzinomzellen nach 72 h Kultivierung auf Kollagen

Tabelle 9 bietet eine Übersicht über den Einfluss einer 72 stündigen Inkubation der Zellen auf Kollagen unter dem Einfluss der beiden Zytostatika CDDP und MX. Verglichen wurden erneut die MCF-7-sc- und MCF-7- β 1-kd-Zellen. Zusätzlich wird für diese und sämtliche folgenden Toxizitätsstudien immer der zusätzlich aufgenommene alleinige Toxizitätswert des Zytostatikums ohne weitere Behandlung abgebildet (\emptyset). Dies gewährleistet, dass die Zellen in allen Experimenten ihre in Tabelle 8 gezeigte Sensitivität beibehalten haben.

Tabelle 9: Übersicht der Zytotoxizität der verwendeten Zytostatika CDDP und MX mit 2000 Zellen nach 72 h Inkubationszeitraum auf Kollagen und die daraus resultierenden Resistenzfaktoren. Zusätzlich sind die nur mit dem Zytostatikum behandelten Kontrollen (\emptyset) aufgetragen.

		MCF-7-sc			MCF7-β1-kd			
Zytostatikum	Inkubations- ansatz	pIC50		IC50 [μmol/L]	pIC50		IC50 [μmol/L]	RF
		MW	STABW		MW	STABW		
Cisplatin	Ø	4,33	0,06	46,7	4,41	0,12	38,7	0,83
	Kollagen	4,54	0,20	28,9	4,60	0,04	24,9	0,86
Mitoxantron	Ø	6,55	0,23	0,28	6,77	0,38	0,17	0,60
	Kollagen	6,91	0,45	0,12	6,99	0,20	0,10	0,85

Exemplarisch zeigt Abbildung 45 die Inkubation der Zellen auf Kollagen unter CDDP und die Inkubation der Zellen auf Kollagen unter MX. Dabei ist zu beachten, dass die MCF-7-sc-Zellen bezüglich der Resistenzbildung auf Kollagen nicht so ausführlich untersucht wurden wie die MCF-7-Wt-Zellen in den zugrunde liegenden Arbeiten, und dass die Zellen durch die genetische Manipulation weniger verlässliche Ergebnisse auf Kollagen erzeugen als die Wt-Zellen. Der beobachtete Effekt des $\beta 1$ -knock-downs gegenüber den MCF-7-sc-Zellen kann somit geringer ausfallen als er es gegenüber den MCF-7-Wt-Zellen ausfallen würde. Hinzu kommt, dass eine Resistenzbildung unter Kollagen nicht konstant reproduziert werden konnte. Um möglichst wissenschaftlich präzise arbeiten zu können, wurde der direkte Vergleich zwischen MCF-7-kd-Zellen und MCF-7-sc-Zellen angestrebt, auch wenn dies in einer möglichen Unterbewertung der beobachteten Effekte resultiert.

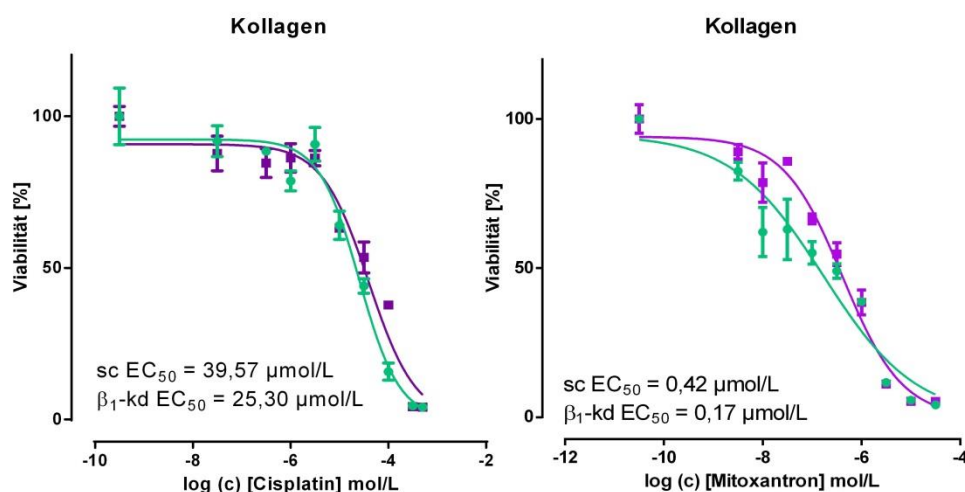


Abbildung 45: Exemplarische Messung der Zytotoxizität von CDDP und MX mit 2000 Zellen über 72 h Inkubationszeit auf Kollagen im Vergleich MCF-7-sc (lila) und MCF-7- $\beta 1$ -kd Zellen (grün).

Beide Zytostatika zeigen eine Abnahme des RF-Wert. Um diesen Effekt näher zu untersuchen, bildet Abbildung 46 den normalisierten RF-Wert ab. Hier ist deutlich erkennbar, wie unter CDDP eine signifikant niedrigere Viabilität der MCF-7- $\beta 1$ -kd-Zellen vorliegt, während die Sensitivität gegenüber MX nicht statistisch signifikant, aber klar in der Tendenz ist.

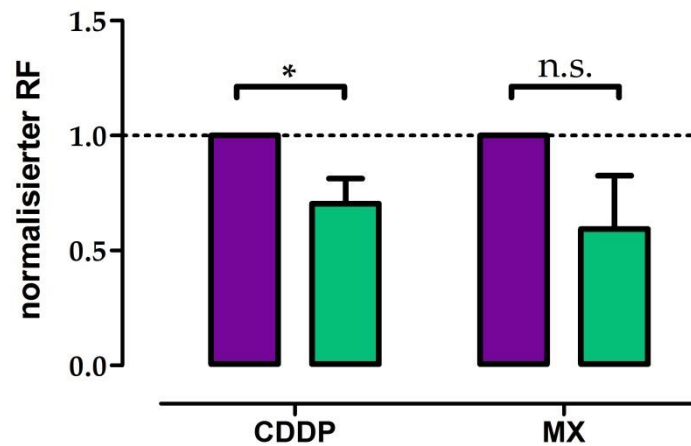


Abbildung 46: Graph der Zytotoxizität von CDDP und MX mit 2000 Zellen über 72 h Inkubationszeit auf Kollagen. Dargestellt sind die gemittelten RF-Werte der in Abbildung 45 exemplarisch gezeigten Replikate, normalisiert auf die MCF-7-sc-Zellen.

5.4.2.4. Auswirkung des *knock-down* der $\beta 1$ Untereinheit auf die Chemoresistenz von MCF-7-Mammakarzinomzellen nach Vorinkubation mit Mangan

Analog zu den Kollagenbefunden bietet Tabelle 10 eine Übersicht über den Einfluss einer Vorinkubation der Zellen mit dem Integrin-Aktivator Mangan.

Tabelle 10: Übersicht der Zytotoxizität der verwendeten Zytostatika CDDP und MX mit 2000 Zellen nach fünf-minütiger Vorinkubation mit Mn^{2+} [1 mM] und die daraus resultierenden Resistenzfaktoren. Zusätzlich sind die nur mit dem Zytostatikum behandelten Kontrollen (Ø) aufgetragen.

		MCF-7-sc			MCF7-β1-kd			
Zytostatikum	Inkubations- ansatz	pIC50		IC50 [μmol/L]	pIC50		IC50 [μmol/L]	RF
		MW	STABW		MW	STABW		
Cisplatin	Ø	4,21	0,11	61,0	4,37	0,10	43,1	0,71
	Mangan	4,29	0,16	51,8	4,59	0,29	25,7	0,50
Mitoxantron	Ø	6,49	0,20	0,32	6,73	0,39	0,18	0,57
	Mangan	6,32	0,38	0,47	6,15	0,18	0,71	1,49

Auch hier werden zwei Beispiele angeführt (Abbildung 47) und die normalisierten RF-Werte statistisch untersucht. Dabei ist die Standardabweichung der Einzelmessung unter MX und Mn^{2+} einer höheren Schwankung unterworfen als gewöhnlich. Des Weiteren nimmt die gemittelte IC_{50} im Vergleich zu den Kontrollgruppen stark zu (Tabelle 10).

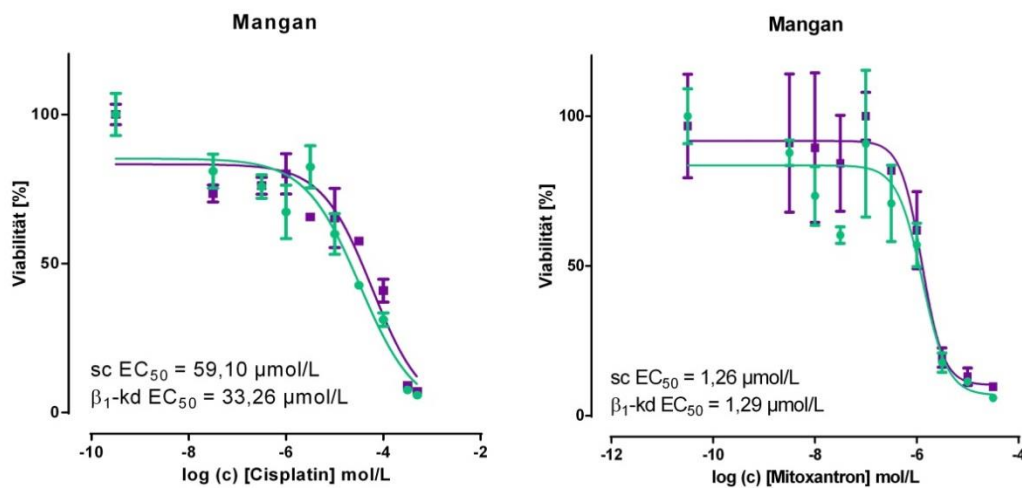


Abbildung 47: Zytotoxizität von CDDP und MX mit 2000 Zellen nach Vorinkubation mit Mangan im Vergleich MCF-7-sc- (lila) und MCF-7- β_1 -kd-Zellen (grün).

Dieser Effekt ist durch die Komplexbildung des Zytostatikums zu erklären, der bereits zuvor näher erläutert wurde. Der Hinweis an dieser Stelle dient lediglich dem besseren Verständnis der Daten und ist auch der Grund, warum auf eine statistische Auswertung der MX- Mn^{2+} -Daten verzichtet wird. Für CDDP zeigt sich eine starke und statistisch signifikante Reduzierung der Viabilität unter dem β_1 -*knock-down*, auch ersichtlich in Abbildung 48.

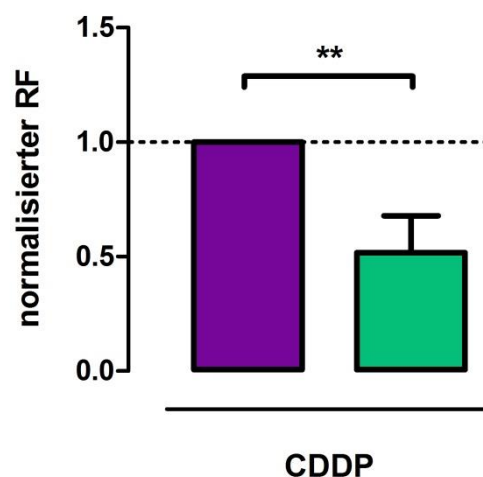


Abbildung 48: Graph der Zytotoxizität von CDDP mit 2000 Zellen nach Vorinkubation mit Mangan. Dargestellt sind die gemittelten und normalisierten RF-Werte der in Abbildung 47 exemplarisch gezeigten Replikate, normalisiert auf die MCF-7-sc-Zellen.

5.4.2.5. Auswirkung des *knock-down* der β 1-Untereinheit auf die Chemoresistenz von MCF-7-Mammakarzinomzellen unter Zusatz des Inhibitors FAK14 alleine und auf Kollagen

Um beurteilen zu können, wie sich der β 1-*knock-down* auf das klassische Integrin-*signaling* auswirkt, wurden die Zellen mit dem Inhibitor FAK14 behandelt. Einmal erfolgte die Behandlung von auf Kollagen gewachsenen Zellen und einmal ohne zusätzliche Inkubationen (Tabelle 11).

Tabelle 11: Übersicht der Zytotoxizität der verwendeten Zytostatika CDDP und MX mit 2000 Zellen nach 24 h Inkubationszeitraum mit FAK14 [1 μ M] und die daraus resultierenden Resistenzfaktoren. Des Weiteren wurde derselbe Ansatz auf Kollagen ausgesät und ebenfalls mit FAK14 [1 μ M] behandelt (Kollagen + FAK14). Zusätzlich sind die nur mit dem Zytostatikum behandelten Kontrollen (\emptyset) und die nur auf Kollagen gewachsenen Kontrollen (Kollagen) aufgetragen.

		MCF-7-sc			MCF7-β1-kd			
Zytostatikum	Inkubations- ansatz	pIC50		IC50 [μmol/L]	pIC50		IC50 [μmol/L]	RF
		MW	STABW		MW	STABW		
Cisplatin	Ø	4,49	0,10	32,2	4,59	0,14	25,5	0,79
	FAK14	4,50	0,07	31,4	4,68	0,21	21,0	0,67
	Kollagen	4,47	0,05	34,1	4,57	0,14	27,1	0,80
	Kollagen + FAK14	4,50	0,19	31,8	4,61	0,07	24,5	0,77
Mitoxantron	Ø	6,53	0,30	0,29	6,66	0,09	0,21	0,74
	FAK14	6,92	0,51	0,12	6,33	0,37	0,47	3,91
	Kollagen	6,89	0,68	0,12	7,08	0,49	0,08	0,65
	Kollagen + FAK14	7,14	0,37	0,07	6,99	0,55	0,10	1,40

Exemplarische Einzelmessungen sind in Abbildung 49 gezeigt. Die Behandlung der CDDP inkubierten Zellen mit FAK14 reduziert den RF-Wert nur geringfügig eine insgesamt starke Beeinflussung bleibt aus. Wachsen die Zellen jedoch zuvor auf Kollagen, so ist dieser Effekt geringer ausgeprägt.

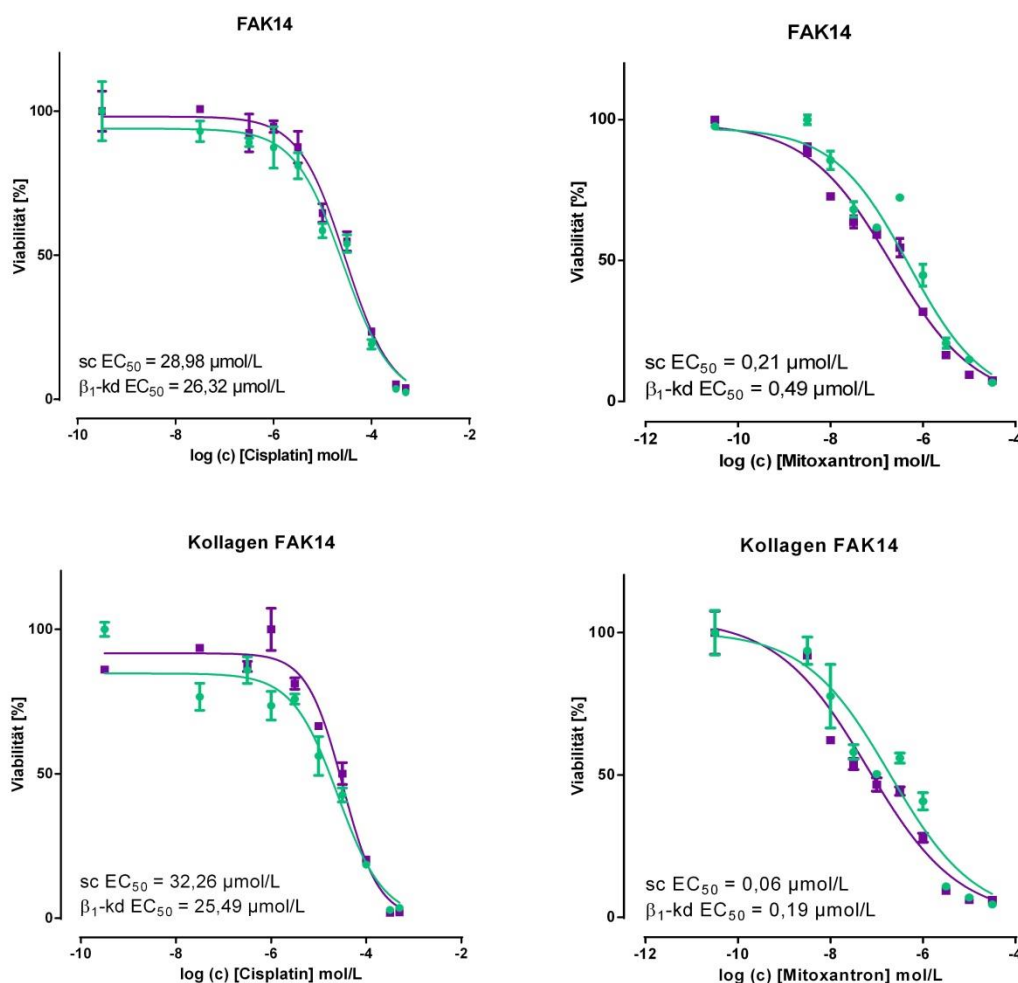


Abbildung 49: Exemplarische Messung der Zytotoxizität von CDDP und MX mit 2000 Zellen über 72 h Inkubationszeit mit FAK14 und mit FAK14 auf Kollagen im Vergleich MCF-7-sc- (lila) und MCF-7-β₁-kd-Zellen (grün).

Unter MX-Behandlung hingegen zeigt sich sowohl für die nur FAK14-behandelten Zellen, als auch für die zusätzlich auf Kollagen kultivierten Zellen eine starke Zunahme der RF-Werte. Die Behandlung mit nur FAK14 steigert den RF-Wert auf das Vierfache seines Ausgangsniveaus. Betrachtet man die IC₅₀-Werte der Messungen zeigt sich bezüglich der IC₅₀-Werte der MCF-7-sc-Zellen unter FAK14-Behandlung (mit und ohne Kollagen) eine Absenkung, während die IC₅₀-Werte der MCF-7-β₁-kd-Zellen nahezu gleichbleiben (Kollagen + FAK14), oder sich erhöhen (FAK14). Eine Abbildung der normalisierten RF-Werte, wie sie zuvor erfolgte, ist in diesem Kontext nicht sinnvoll, da diese Form der Darstellung die Sensitivierung der MCF-7-sc-Zellen gegenüber FAK14 und den MCF-7-β₁-kd-Zellen nicht wiedergibt bzw. sie auf eine für den Leser nicht direkt zugängliche Art abbildet.

5.4.3. Schlussfolgerungen

Der *knock-down* der $\beta 1$ -Expression in MCF-7-Zellen erwies sich mit einer Reduzierung um rund 86 % als höchst effektiv. Die starke Reduzierung an $\beta 1$ -Integrinuntereinheiten führte konsequenterweise zu direkten morphologischen Veränderungen der MCF-7- $\beta 1$ -kd-Zellen. Während die MCF-7-sc-Zellen analog zu ihren Wildtyp-Vorgängern wuchsen, zeigten die MCF-7- $\beta 1$ -kd-Zellen eine stark attenuierte Bindungsfähigkeit an die Kollagenoberfläche. Die Zellen bildeten vermehrt Cluster aus, in denen vor allem Zell-Zell-Bindungen eine entscheidende Rolle zu spielen scheinen. Experimente in MDA-MB-231 triple-negativen Brustkrebszellen mit induziertem $\beta 1$ -*knock-out* zeigten analoge morphologische Veränderungen (337) und die spezifische Blockade mittels eines $\beta 1$ -bindenden Antikörpers in MCF-7-Zellen führte ebenfalls zu einer vermehrten Aggregation der Zellen (338). Die Untersuchungen dieser Arbeiten zeigen darüber hinaus, dass die Manipulation der $\beta 1$ -Untereinheit sich auf die Tumorigenität auswirkt und setzen diese Effekte in den Kontext des FAK/PI3K/Akt-*signalings*.

Die beobachtete verminderte Wechselwirkung der MCF-7- $\beta 1$ -kd-Zellen mit der ECM sollte sich folglich in einer erhöhten Sensitivität gegenüber CDDP und MX auf Kollagen und unter der Behandlung mit Mangan äußern, da die Zelle sich nicht mehr bzw. vermindert über die $\beta 1$ -Untereinheit mittels Einleitung und Aufrechterhaltung einer CAM-DR schützen kann. Um diese Annahmen zu überprüfen wurden die *knock-down* Klone zuerst ohne Inkubation mit Integrin-Aktivatoren gegen ihre Transfektionskontrollen verglichen. Es zeigte sich, dass die Zellen unterschiedlich empfindlich gegenüber den beiden verwendeten Zytostatika geworden sind. Die Empfindlichkeit gegenüber MX ist deutlich stärker ausgeprägt als gegenüber CDDP verglichen mit den MCF-7-sc-Zellen. Diese Erkenntnis untermauert die Hypothese, einer divergierenden Zellantwort nach Inkubation der Zellen mit Zytostatika unterschiedlicher Wirkungsmechanismen. Die MCF-7- $\beta 1$ -kd-Zellen reagierten darüber hinaus auch empfindlicher als die MCF-7-sc-Zellen auf Kollagen und gegenüber Mangan. Dabei war vor allem die Sensitivierung gegenüber CDDP signifikant ausgeprägt und es ist davon auszugehen, dass diese noch deutlicher ausfällt im Vergleich mit MCF-7-Wt-Zellen. Die Bildung vermeintlich starker Resistenzen unter Mangan mit MX lassen sich durch die Komplexierung des Zytostatikums erklären. Die verminderten Zytostatika Konzentrationen führen bei dieser empfindlichen Technik offensichtlich zu einer

Messungenauigkeit, was die hohen Standardabweichungen der einzelnen Messwerte und die aus den Messungen resultierenden hohen RF-Werte von 1,49 erklärt. Zusammengefasst zeigen die MTT-Untersuchungen mit Kollagen und Mangan aber bereits, dass eine Resistenzformation über die Integrine nur noch bedingt unter der Einwirkung von CDDP stattfindet, während die MCF-7- β 1-kd-Zellen gegenüber MX geringere Effekte aufzeigen.

Um die zuvor an den MCF-7 festgestellte Abhängigkeit von über FAK/PI3K/Akt-*signaling* vermittelten Resistenzen zu bestätigen, wurden die Zellen zusätzlich mit dem FAK-Inhibitor „FAK Inhibitor 14“ behandelt. Wie bereits in Abbildung 38 gezeigt werden die MCF-7-sc-Zellen, wenn gleich geringer, sensitiviert, während die MCF-7- β 1-kd-Zellen nur unter CDDP eine Sensitivierung aufweisen. Es bekräftigt sich somit der bereits auf Kollagen und unter Mangan gewonnene Eindruck, einer unter CDDP primär über das β 1-Integrin vermittelten Resistenzbildung, die über die ihm direkt nachgeschaltete FAK/PI3K/Akt-Signalkaskade abläuft. Unter MX hingegen werden die Zellen unter Verwendung des FAK-Inhibitors scheinbar resistenter. Dieser Eindruck entsteht, da die MCF-7-sc-Zellen sensitiviert werden, während die MCF-7- β 1-kd-Zellen auf ihrem Ausgangsniveau verbleiben. Somit ist die IC₅₀ in den MCF-7- β 1-kd-Zellen größer, als die der MCF-7-sc-Zellen, was den stark erhöhten RF-Wert bedingt. Folglich handelt es sich also nicht um eine Resistenzsteigerung durch den Inhibitor, sondern vielmehr um ein Ausbleiben der Sensitivierung in den MCF-7- β 1-kd-Zellen. Somit sind die Zellen durch den *knock-down* der β 1-Untereinheit nicht mehr länger der Sensitivierung durch den FAK14 Inhibitor unter MX zugänglich. Es liegt also die Vermutung nahe, dass die Zellen im Unterschied zur CDDP-Behandlung, wo die Inhibition der geringen FAK Restaktivität zu einer Sensitivierung führt, auf die MX-Behandlung mit der Aktivierung weiterer Signalwege reagiert.

Dabei kommen vor allem solche Signalwege infrage, die über eine Vernetzung zu den bereits untersuchten Signalwegen in Kontakt stehen, oder durch andere ECM-Bindungspartner angesteuert werden können und die im vorangegangenen Screening eine interessante Signatur aufwiesen. Berücksichtigt man darüber hinaus die Erkenntnisse aus den β 1-*knock-out* MDA-MB-231 Zellen und den mit dem β 1-blockierenden Antikörper an MCF-7-Zellen erzielten Resultaten, so liegt neben dem FAK/PI3K/Akt-*signaling* eine Involvierung des MAPK-Signalweges nahe. Hinzu kommt,

dass in MCF-7-Zellen bereits eine Verknüpfung zwischen anderen β -Untereinheiten ($\beta 3$) und einer Überaktivierung des MAPK Signalweges bewiesen werden konnten (339).

5.5. Signalweg 3: MAPK-signaling

5.5.1. Einleitung

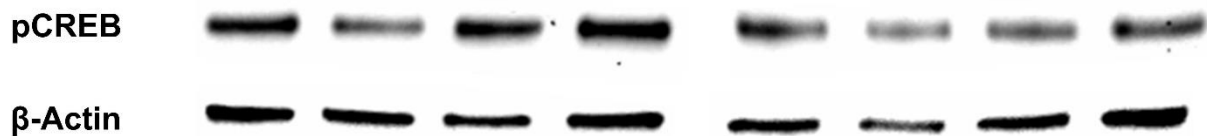
Unter den im Screening am stärksten beeinflussten Kinasen befindet sich das pCREB. Die Phosphorylierung von CREB wird dabei innerhalb des klassischen MAPK-Signalweges durch die RSK2 realisiert, die wiederum durch ERK aktiviert wird. Die Phosphorylierung der RSK1/2/3 erfolgt im *Profiler* ähnlich der Phosphorylierung der CREB, während sich auf der ERK-Ebene keine Veränderung ergab. Somit wurden als Nächstes Komponenten des klassischen MAPK Signalweges untersucht, darunter MEK, ERK und CREB, die alle unterschiedliche Regulierungsmuster aufwiesen, abhängig von der Inkubation mit oder ohne MX. Auf die Untersuchung der Zellen unter CDDP wurde verzichtet, da die Zellen im *knock-down* Experiment im Vergleich zur *scrambled* Kontrolle nicht signifikant sensitiviert wurden, und weil sie auf eine FAK-Inhibierung analog zu den MCF-7-Wt-Zellen reagieren. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der primäre Mechanismus der CDDP vermittelten CAM-DR über FAK/PI3K/Akt-signaling abläuft und dass die $\beta 1$ -Inhibierung (hier realisiert durch den *knock-down*) nicht zu einem Shift auf einen anderen Signalweg leitet. Eine mögliche parallele Aktivierung des MAPK-signaling über andere Mechanismen, unter der Behandlung mit CDDP, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Um einen genauen Überblick über alle ablaufenden Veränderungen der MAPK-Marker (MEK, ERK, CREB) zu erhalten, wurden die Zellen sowohl ohne den Einfluss von MX, als auch unter MX untersucht. Zusätzlich wurden die Zellen mit den bereits zuvor besprochenen Integrinaktivatoren Mn^{2+} und Kollagen, sowie deren Kombination behandelt.

5.5.2. Ergebnisse

5.5.2.1. Einfluss der Integrin-Aktivierung auf die Expression von Schlüssel-proteinen des MAPK-Signalweges in MCF 7-Mammakarzinomzellen unter dem Einfluss von MX

A)



Kollagen	-	-	+	+	-	-	+	+
Mn ²⁺	-	+	-	+	-	+	-	+
MX	-	-	-	-	+	+	+	+

B)

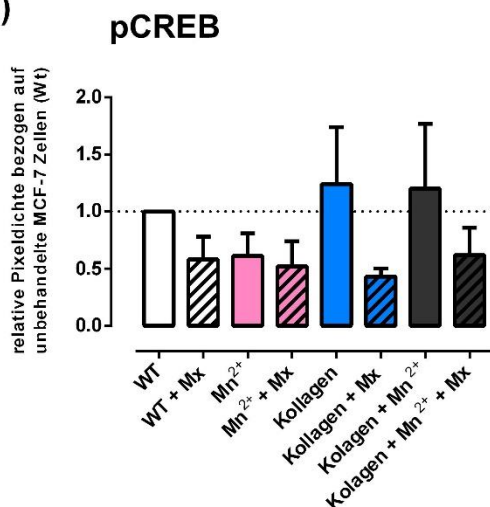
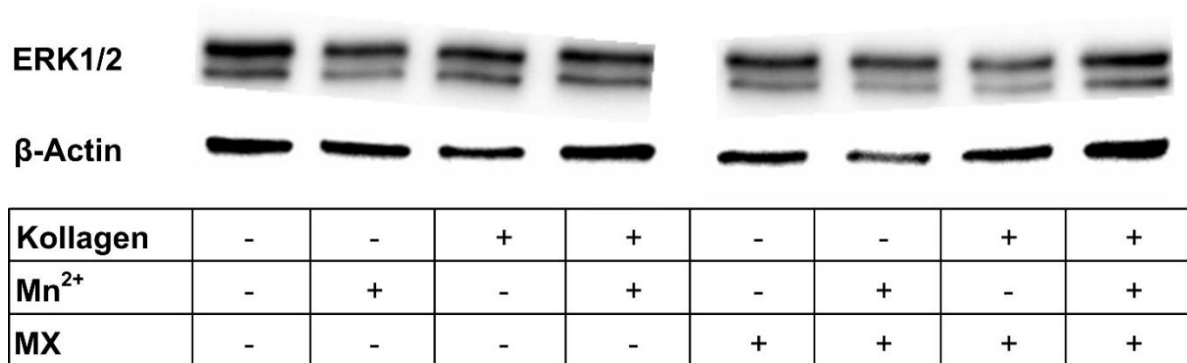


Abbildung 50: A) Westernblot der pCREB nach der Behandlung ohne und mit MX [262 nM]; unstimuliert, stimuliert mit Mn²⁺ [1 mM], Kollagen und der Kombination beider B) Pixeldichtenanalyse des Westernblot aus A; dargestellt sind MCF-7-Zellen ohne MX und mit MX- (diagonalgestreift) Inkubation [262 nM], auf Kollagen (blau), mit Mn²⁺ (rosa) und der Kombination (schwarz) nach 72 h Inkubationszeit.

Als finale Zielstruktur des MAPK-Signalweges wurde die pCREB untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 50 dargestellt. Während unter Mn²⁺ eine verringerte Expression sichtbar wird, ist unter Kollagen und Kollagen mit Mn²⁺ die Menge an

pCREB leicht erhöht. Die Inkubation mit MX senkt das Gesamtausmaß an pCREB ab, bestätigt darüber hinaus aber dasselbe Verhalten wie es sich bereits in den MX unbehandelten Zellen zeigte. Als vorgeschaltetes Signalmolekül wurde die ERK1/2 und die phosphorylierte Form pERK1/2 untersucht.

A)



B)

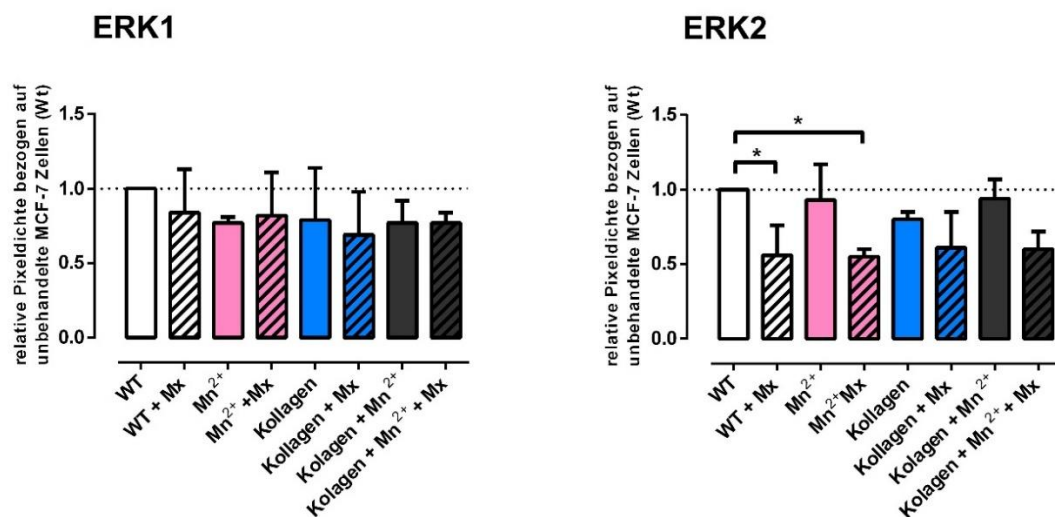
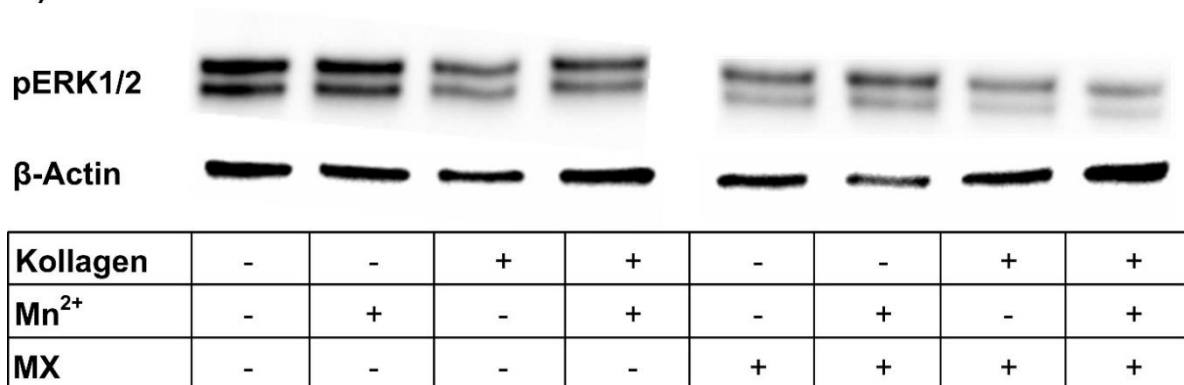


Abbildung 51: A) Westernblot der ERK1/2 nach der Behandlung mit und ohne MX [262 nM]; unstimuliert oder stimuliert mit Mn²⁺ [1 mM], Kollagen und der Kombination beider. Die obere der gezeigten Banden repräsentiert ERK1, die untere ERK2. B) Pixeldichtenanalyse des Westernblot aus A; dargestellt sind MCF-7-Zellen ohne MX- und mit MX- (diagonalgestreift) Inkubation [262 nM], auf Kollagen (blau), mit Mn²⁺ [1 mM] (rosa) und der Kombination (schwarz) nach 72 h Inkubationszeit.

Betrachtet man ERK1 so ist unter Mn²⁺, wie auch für pCREB die Intensität leicht erniedrigt. Sowohl Kollagen als auch die Kombination beider Behandlungen weisen in der Tendenz eine leichte Verringerung ohne signifikante Beeinflussung auf. Für die ERK2 zeigt sich dasselbe Bild wie für die ERK1, bei leicht höheren Intensitäten unter

Mn²⁺-Behandlung. Unter dem Einfluss von MX nimmt die Expression an ERK1 in den nur mit MX behandelten Zellen signifikant ab. Analog dazu verhalten sich die mit Mn²⁺/MX behandelten Zellen. Alle weiteren Behandlungen sind für die ERK1 mit MX gleich den nicht mit MX behandelten Zellen. Für die ERK2 zeigt sich eine tendenziell niedrigere Expression in den mit Kollagen inkubierten und mit der Kombination aus Kollagen und Mn²⁺ unter MX inkubierten Zellen.

A)



B)

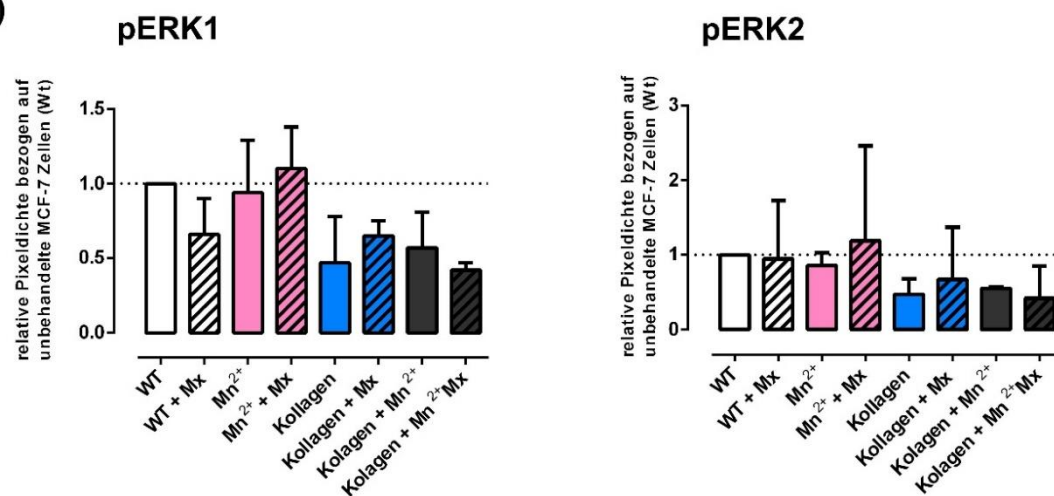


Abbildung 52: A) Westernblot der pERK1/2 nach der Behandlung mit und ohne MX [262 nM]; unstimuliert oder stimuliert mit Mn²⁺ [1 mM], Kollagen und der Kombination beider. Die obere der gezeigten Banden repräsentiert pERK1, die untere pERK2. B) Pixeldichtenanalyse des Westernblot aus A; dargestellt sind MCF-7-Zellen ohne MX- und mit MX- (diagonalgestreift) Inkubation auf Kollagen (blau), mit Mn²⁺ [1 mM] (rosa) und der Kombination (schwarz) nach 72 h Inkubationszeit.

Schaut man sich nun die Phosphorylierung von ERK1/2 an, so wird ersichtlich, dass für die pERK1 unter Mangan kein Unterschied vorliegt. Die Kultivierung auf Kollagen und in der Kombination führt hingegen zu einer Erniedrigung. Betrachtet man den Einfluss

von MX sind außer in der mit Mn^{2+} behandelten Zellpopulation alle anderen Phosphorylierungslevel verringert. Für pERK2 gelten dieselben Tendenzen. Um den Effekt der Behandlungen besser beurteilen zu können, wurden zusätzlich die ERK- und pERK-Messungen aus Abbildung 51 und Abbildung 52 zueinander ins Verhältnis gesetzt, indem der Quotient pERK/ERK für ERK1 und ERK2 aller acht Messungen gebildet wurde. Er setzt somit die Gesamtmenge des Proteins mit seiner Phosphorylierung ins Verhältnis.

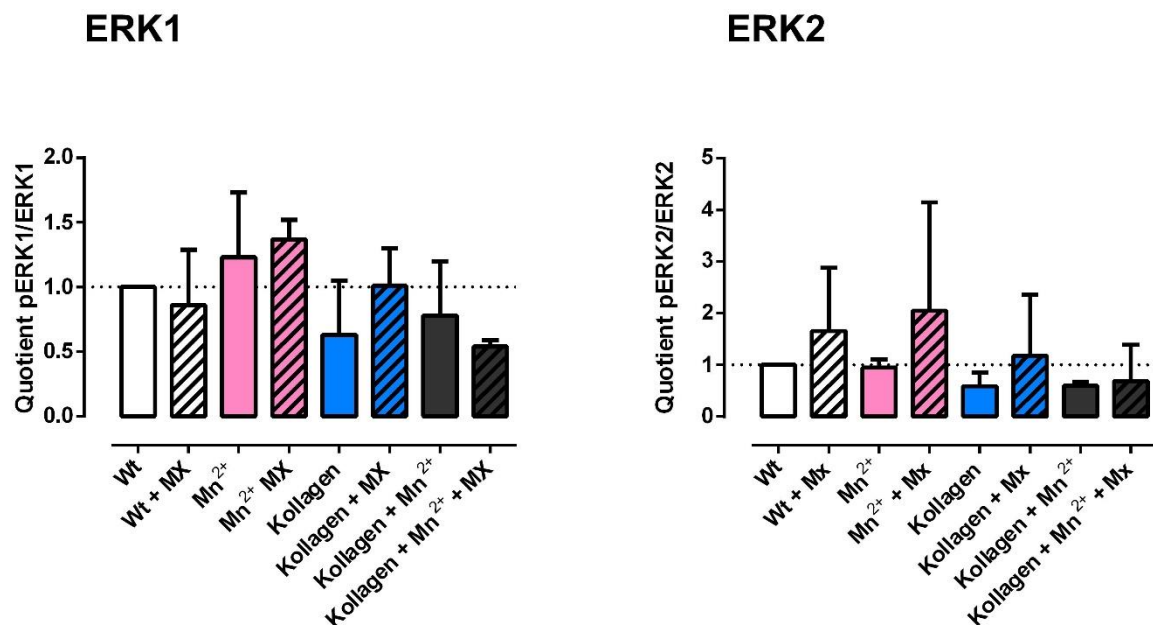


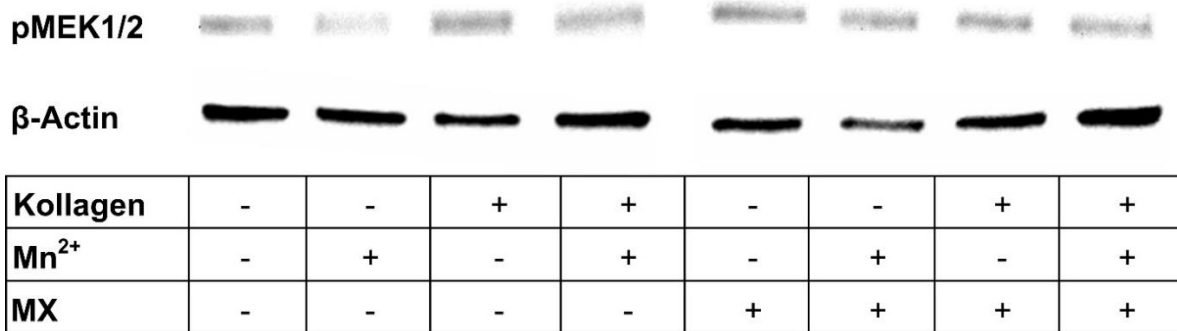
Abbildung 53: Quotienten der Pixeldichtenanalysen von pERK und ERK aus Abbildung 51 und Abbildung 52. Dargestellt sind MCF-7-Zellen ohne MX- und mit MX- (diagonalgestreift) Inkubation auf Kollagen (blau), mit Mn^{2+} [1 mM] (rosa) und der Kombination (schwarz) nach 72 h Inkubationszeit.

Der Quotient aus Abbildung 53 zeigt für beide ERK-Isoformen eine Erhöhung unter Mn^{2+} mit MX. Unter Kollagen erhöht der Einfluss von MX die pERK-Level im Vergleich zu nur auf Kollagen gewachsenen Zellen. ERK1 scheint zusätzlich in den nur mit MX behandelten Zellen erhöht.

Abschließend wurde die Expression der pMEK1/2 untersucht, die als vorgeschaltete Kinase die ERK phosphorylieren kann. Abbildung 54 A zeigt, dass für die pMEK1/2 nur eine Bande (dimere Struktur) geringer Intensität sichtbar wird. Dabei lässt sich unter Mn^{2+} eine tendenzielle Abnahme feststellen, während die Inkubation auf Kollagen zu

einer leichten Erhöhung führt. Unter der Behandlung mit MX wird nur in den unbehandelten Zellen und unter Kollagen eine Abnahme der Phosphorylierung sichtbar. Die Kombination beider Behandlungen führt zu einer Erhöhung.

A)



B)

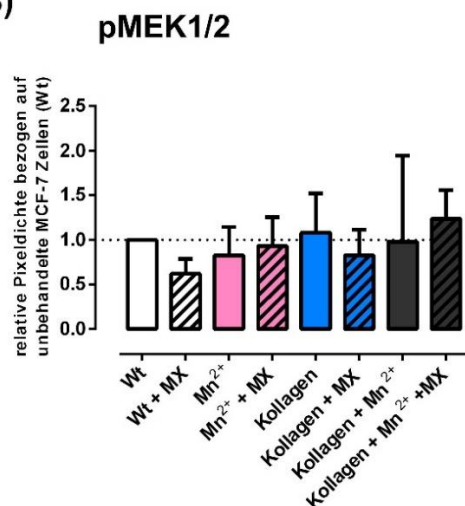


Abbildung 54: A) Westernblot der pMEK1/2 nach der Behandlung mit und ohne MX [262 nM] unstimuliert oder stimuliert mit Mn²⁺ [1 mM], Kollagen und der Kombination beider B) Pixeldichtenanalyse des Westernblot aus A; dargestellt sind MCF-7-Zellen ohne MX- und mit MX- (diagonalgestreift) Inkubation [262 nM], auf Kollagen (blau), mit Mn²⁺ [1 mM] (rosa) und der Kombination (schwarz) nach 72 h Inkubationszeit.

5.5.2.2. Einfluss der Integrin-Aktivierung auf die Expression von Schlüsselproteinen des MAPK-Signalweges in MCF-7-sc und MCF-7- β 1-kd-Mammakarzinomzellen unter dem Einfluss von MX

Um nun den Einfluss des β 1-*knock-downs* auf den MAPK-Signalweg zu untersuchen, wurden erneut Westernblots für pCREP, ERK 1/2, pERK 1/2 und pMEK 1/2 angefertigt allerdings diesmal unter der Verwendung der MCF-7-sc- und der MCF-7- β 1-kd-Zelllinie. Dies fand sowohl mit als auch ohne MX-Behandlung statt.

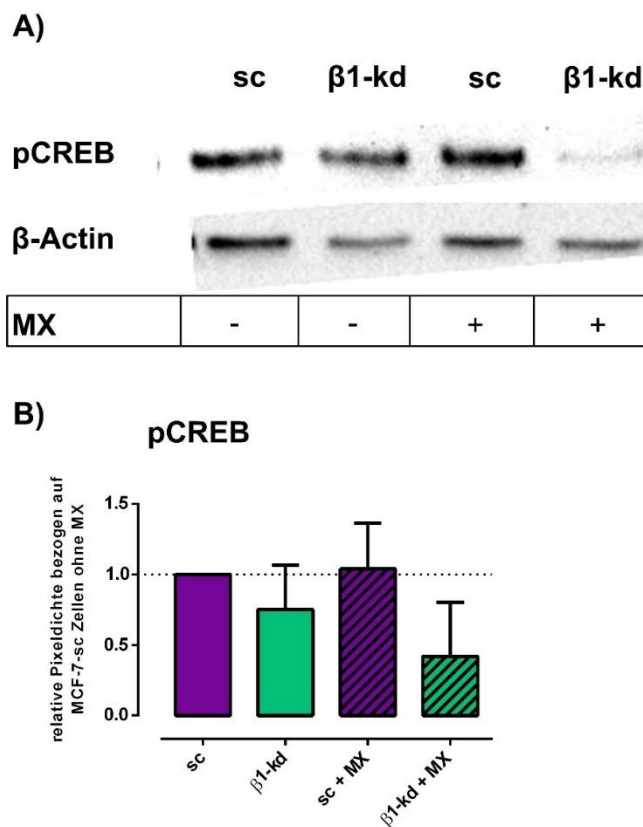
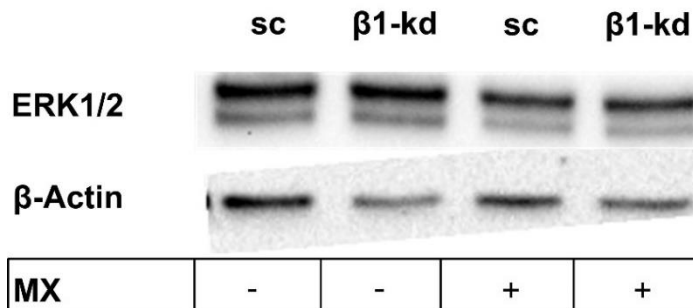


Abbildung 55: **A)** Westernblot der pCREB nach der Behandlung mit und ohne MX [262 nM] in MCF-7-sc und MCF-7- β 1-kd Zellen **B)** Pixeldichtenanalyse des Westernblot aus **A** dargestellt sind MCF-7-sc (lila) und MCF-7- β 1-kd (grün) ohne und mit MX [262 nM] (diagonalgestreift) nach 72 h Inkubationszeit.

Aus Abbildung 55 wird ersichtlich, wie in den MCF-7- β 1-kd die Phosphorylierung an CREB abnimmt. Diese Deregulierung wird zusätzlich verstärkt, wenn die Zellen mit MX inkubiert wurden. Die Phosphorylierung in den MCF-7-sc-Zellen hingegen bleibt auch unter MX auf dem Ausgangsniveau. Betrachtet man nun die vorgeschaltete ERK1/2, so zeigt sich für ERK1 und ERK2, eine Erhöhung der Expression in den MCF-7- β 1-kd, während nur ERK1 tendenziell vermehrt in den MCF-7-sc-Zellen exprimiert wird. Die

ERK2 hingegen ist in den mit MX behandelten MCF-7-sc- und MCF-7- β 1-kd-Zellen vermindert, wie aus Abbildung 56 ersichtlich.

A)



B)

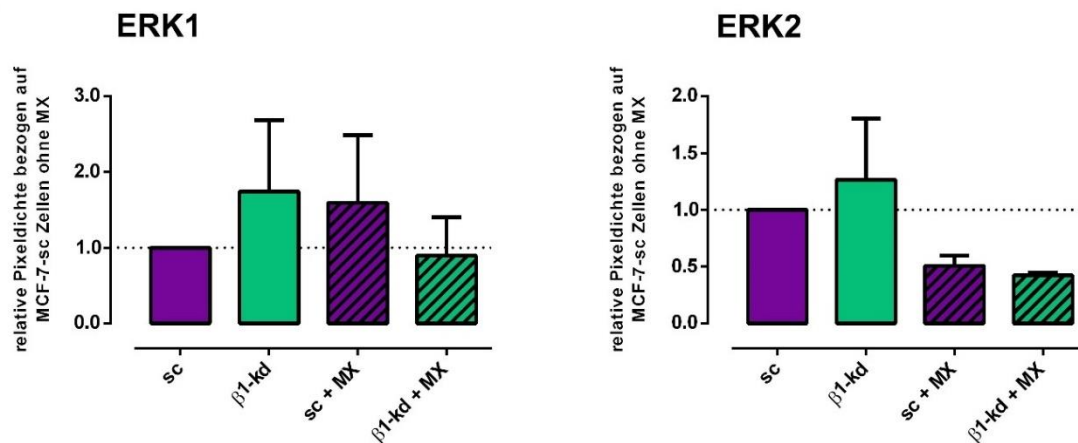


Abbildung 56: A) Westernblot der ERK1/2 nach der Behandlung mit und ohne MX [262 nM] in MCF-7-sc- und MCF-7- β 1-kd-Zellen B) Pixeldichtenanalyse des Westernblot aus A dargestellt sind MCF-7-sc (lila) und MCF-7- β 1-kd (grün) ohne und mit MX [262 nM] (diagonalgestreift) nach 72 h Inkubationszeit.

Betrachtet man nun die Phosphorylierung der ERK1/2 in Abbildung 57, sieht man eine leichte Reduktion an sowohl pERK1 als auch pERK2 in den MCF-7- β 1-kd verglichen mit den MCF-7-sc-Zellen. Der Zusatz von MX reduziert in beiden Zelllinien drastisch die Menge an pERK1 und pERK2, dabei nimmt interessanterweise die Phosphorylierung in den MCF-7- β 1-kd-Zellen weniger stark ab. Abbildung 57 illustriert diese Vorgänge.

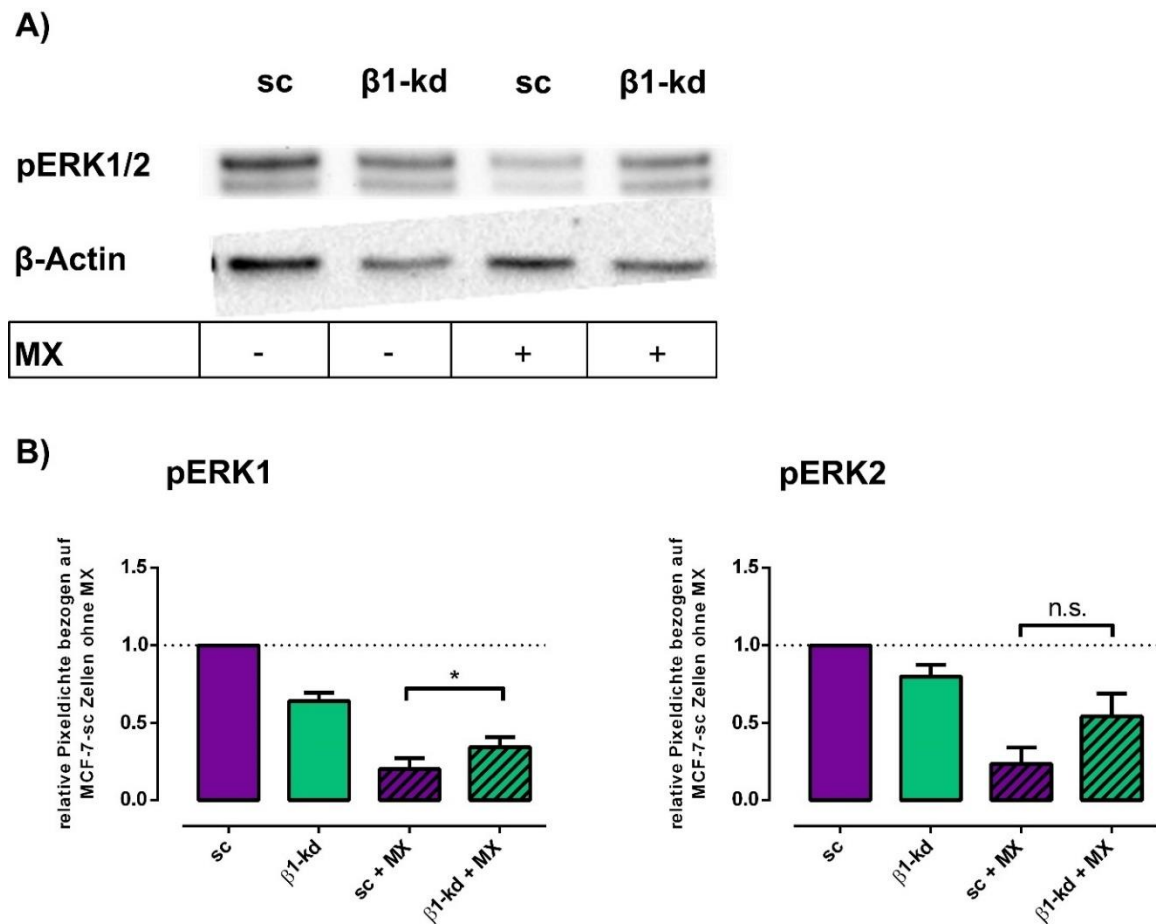


Abbildung 57: **A)** Westernblot der pERK1/2 nach der Behandlung mit und ohne MX [262 nM] in MCF-7-sc- und MCF-7- $\beta 1$ -kd-Zellen **B)** Pixeldichtenanalyse des Westernblot aus **A**; dargestellt sind MCF-7-sc (lila) und MCF-7- $\beta 1$ -kd (grün) ohne und mit MX [262 nM] (diagonalgestreift) nach 72 h Inkubationszeit.

Analog zu der Betrachtung aus Abbildung 53 für die genetisch nicht modifizierten MCF-7-Zellen, zeigt Abbildung 58 für die MCF-7-sc- und MCF-7- $\beta 1$ -kd-Zellen den Quotienten gebildet aus ERK und pERK.

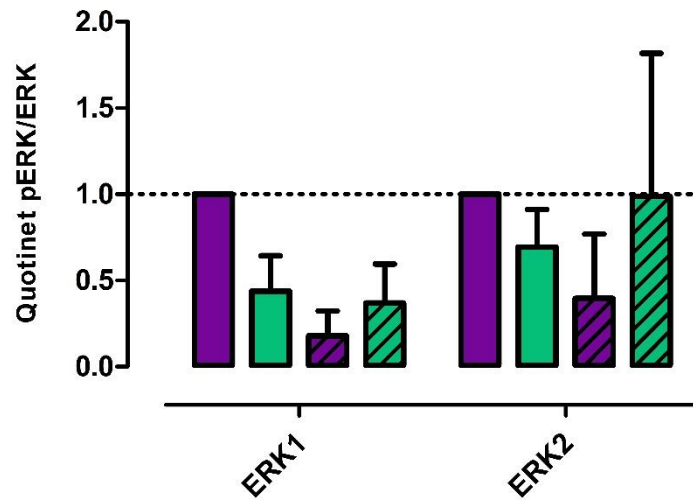


Abbildung 58: Quotient der Pixeldichtenanalysen von pERK und ERK aus Abbildung 56 und Abbildung 57. Dargestellt sind MCF-7-sc (lila) und MCF-7-β1-kd (grün) ohne und mit MX [262 nM] (diagonalgestreift) nach 72 h Inkubationszeit.

Im Verhältnis nimmt die Phosphorylierung an ERK1, als auch an ERK2 in den MCF-7-β1-kd-Zellen ab. Werden die Zellen mit MX behandelt, nimmt der Quotient in den MCF-7-sc-Zellen stark ab, während er in den MCF-7-β1-kd-Zellen konstant bleibt bezogen auf die ERK1 und zunimmt bezogen auf die ERK2.

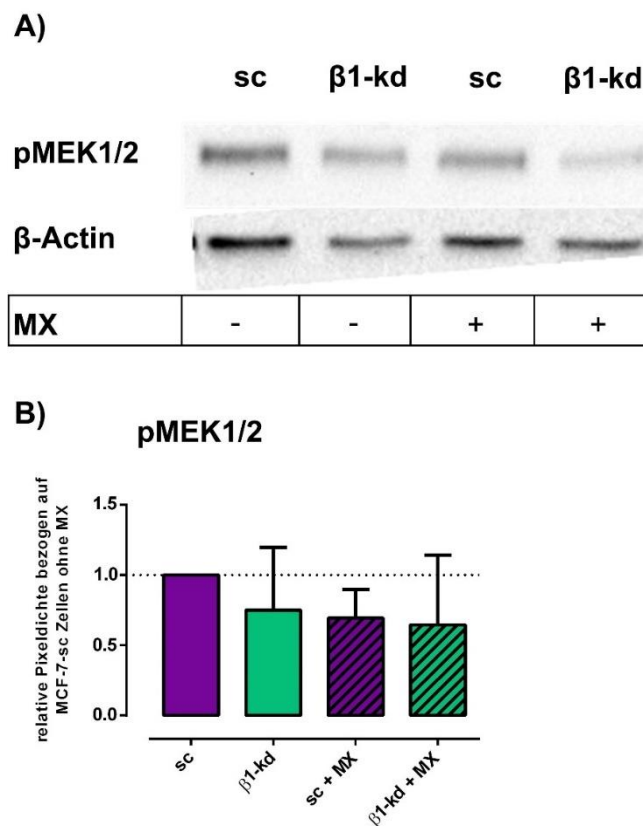


Abbildung 59: **A)** Westernblot der pMEK1/2 nach der Behandlung mit und ohne MX [262 nM] in MCF-7-sc- und MCF-7- $\beta 1$ -kd-Zellen **B)** Pixeldichtenanalyse des Westernblot aus **A** dargestellt sind MCF-7-sc (lila) und MCF-7- $\beta 1$ -kd (grün) ohne und mit MX [262 nM] (diagonalgestreift) nach 72 h Inkubationszeit.

Abschließend wurde, wie schon in den MCF-7-Zellen angeführt, die Phosphorylierung der MEK1/2 untersucht. Hier zeigt sich eine geringe Expression, die sich ähnlich der pCREB Daten verhält. Abbildung 59 zeigt, dass in den MCF-7- $\beta 1$ -kd-Zellen verringerte Level an pMEK1/2 exprimiert werden, und dass tendenziell die Inkubation mit MX die Expression in beiden Zelllinien verringert.

5.5.3. Schlussfolgerungen

Betrachtet man die Expression von pCREB, scheint innerhalb der genetisch unveränderten und Zytostatika unbehandelten MCF-7-Zelle eine geringe CREB-Aktivierung durch eine Kollagen-vermittelte Integrin-Aktivierung stattzufinden, während der Einfluss von Mangan eher eine deaktivierende Wirkung entfaltet. Nimmt man nun den Zytostatika-Einfluss dazu, nehmen die Proteinlevel insgesamt ab. Die im Array beobachtete Steigerung unter Kollagen/MX bleibt aus. Da der *Profiler* lediglich als

Hinweisgeber betrachtet werden sollte, kann der Unterschied durch die abweichende Stichprobengröße erklärt werden. Die ausbleibende CREB-Aktivierung unter MX kann allerdings auch durch die Tatsache erklärt werden, dass eine Phosphorylierung dieses Substrates über verschiedene vorgeschaltete Kinasen erfolgen kann und somit nicht ausschließlich über den MAPK-Signalweg initiiert werden muss. Des Weiteren ist eine Aktivitätssteigerung nicht vollständig auszuschließen, da Veränderungen der Expression der nicht-phosphorylierten Form nicht untersucht wurden. Somit besteht die Möglichkeit, dass relativ gesehen zur absoluten Menge an CREB, eine vermehrte Phosphorylierung unter MX-Behandlung festgestellt werden kann.

Der wichtigste *upstream*-Effektor von CREB innerhalb des MAPK-Signalweges ist die ERK1/2. Die Untersuchung erstreckte sich bei dieser Zielstruktur sowohl auf die phosphorylierte als auch auf die nicht-phosphorylierte Form. Beide Unterformen werden wie CREB unter dem Einfluss von MX herabreguliert. Dabei ist die Expression der ERK1/2 nur geringfügigen Veränderungen innerhalb der mit und ohne MX behandelten Zellpopulationen unterworfen, was eine stabile Expression vermuten lässt. Die phosphorylierte ERK hingegen scheint unter Kollagen verringert und nach MX-Behandlung, im Vergleich zum WT, in allen Ansätzen attenuiert. Die Betrachtung des Quotienten verdeutlicht, dass lediglich unter Mangan eine geringfügige Aktivitätssteigerung zu verzeichnen ist. Somit ist eine direkte Aktivierung der ERK über die Inkubation mit MX nicht festzustellen. Es bestätigt sich aber, wie für die pCREB, dass ein Ansprechen auf die Kollagenbehandlung erfolgt, hier allerdings durch eine Hochregulierung unter MX verglichen mit alleiniger Kollagenbehandlung. Um diesen Kollageneinfluss weiter zu untersuchen, wurde zusätzlich die vorgeschaltete Kinase MEK analysiert, welche als Zielstruktur direkt ERK aktiviert. Die pMEK1/2-Expression scheint dabei wenig durch die MX-Inkubation beeinflusst. Auffälliger Weise nimmt sie jedoch auf Kollagen mit MX ab, während sie nur auf Kollagen geringfügig erhöht ist.

Zusammengefasst stellt sich vor allem für die MCF-7-Zellen unter Kollagen- und Kollagen/MX-Einfluss ein Ansprechen des MAPK-Signalweges heraus. Dabei fällt die zelluläre Antwort jedoch gering aus, wodurch dieser Mechanismus wahrscheinlich nicht primär für die Resistenzbildung verantwortlich ist. Die geringfügige Kompensation durch Kollagen in Abbildung 38 unter MX könnte somit aus dieser geringen MAPK-Aktivität entstehen.

Eine solche Regulierung kann auch erklären, warum die MCF-7- β 1-kd-Zellen in den initialen Untersuchungen (5.4.2.5) nur geringfügig auf den FAK Inhibitor angesprochen haben und eine signifikante Sensitivierung auf Kollagen ausblieb, da die Zellen sich über einen zweiten Mechanismus zusätzlich schützen. Da die primäre Resistenzbildung in den MCF-7-Zellen bezogen auf die CAM-DR scheinbar über FAK/PI3K/Akt-*signaling* vermittelt wird und von dort mit dem MAPK-Signalweg vernetzt ist ergeben sich hier interessante Ansätze. Bezogen auf die MCF-7- β 1-kd-Zellen, die unter MX weniger stark auf die Inhibierung des primär Weges ansprechen stellt sich die Frage, ob sich die Expression dieses Signalweges nach der Einführung des β 1-*knock-down* ebenfalls verändert.

Betrachtet man nun die MCF-7- β 1-kd-Zellen bezüglich der ERK-Aktivierung, wird deutlich, dass die Phosphorylierung beider Isoformen gegenüber den MCF-7-sc-Zellen unter MX-Behandlung ansteigt. Obwohl insgesamt weniger ERK unter MX exprimiert ist, scheint das *signaling* unter dem *knock-down* einen kompensatorischen *Shift* von FAK/PI3K/Akt-*signaling* hin zu MAPK-*signaling* zu durchlaufen, und ermöglicht es der Zelle dadurch weiterhin dem zytotoxischen Stress entgegen zu wirken. Die Betrachtung des Quotienten bestätigt diese Annahme. Ein solcher *Shift* konnte bereits in Prostatakarzinom Zellen im Zusammenhang einer dualen Blockade des PI3K/Akt/mTOR und Ras/Raf/MEK/ERK Signalweges beobachtet werden, auch wenn er nicht im Kontext einer CAM-DR untersucht wurde (340). Die Aktivierung von MEK und CREB hingegen scheint unter MX verringert. Da es sich um eine Signalkaskade handelt, kann diese Tatsache verschiedene Ursachen haben. So ist eine Zeitabhängigkeit der ablaufenden Prozesse gegeben, die dazu führen kann, dass nach der Arretierung der Signalkaskade zu einem bestimmten Zeitpunkt nur ein bestimmtes Muster der sukzessiven Phosphatgruppenübertragung erfasst wurde. Zu einem früheren Zeitpunkt würde folglich die MEK und zu einem späteren Zeitpunkt die Phosphorylierung an CREB stärker aktiviert sein. Darüber hinaus ist für die Aktivität der pERK und der pCREB auch die Translokation in den Nukleus ausschlaggebend, was eine Untersuchung der Lokalisation der beiden Effektormoleküle innerhalb der zellulären Kompartimente für weitere Arbeiten attraktiv macht. Interessant ist nun, ob sich diese Deregulierungen auch auf die funktionelle Ebene auswirken. Falls dies möglich sein sollte, würde sich die hier identifizierte Signalkaskade als Zielstruktur in der Sensitivierung von MCF-7-Zellen

einsetzen lassen. Somit wäre es gelungen, einen weiteren potentiellen Ansatzpunkt für die Überwindung der CAM-DR in Brustkrebserkrankungen zu identifizieren und die Ausgangshypothese dieser Arbeit, bezüglich der zugrunde liegenden *signaling*-Mechanismen, sofern es die MCF-7-Zelllinie betrifft, zu beantworten.

5.6. Inhibitoren des MAPK-*signalings*

5.6.1. Einleitung

Um dieser Idee nachzugehen, sie zu bestätigen und die Signalstrukturen weiter zu untersuchen, wurden die Zellen mit Inhibitoren der einzelnen Zielstrukturen inkubiert. Zum Einsatz kamen SCH772984 (ERK Inhibitor), U0126 (MEK Inhibitor) und 666-15 (CREB Inhibitor). Untersucht wurde, ob die Zellen nach Aktivierung auf Kollagen in den MCF-7- β 1-kd-Zellen, oder den MCF-7-sc-Zellen empfindlicher auf den Inhibitor reagieren. Auf die Untersuchung von Mangan wurde absichtlich verzichtet, da die Experimente in den MX behandelten Zellen wenig Aussagekraft besitzen und die vorherigen Ergebnisse Kollagen als potentesten Einfluss identifiziert haben. Somit wurde immer die generelle Wirkung des Inhibitors gegenüber der Wirkung des Inhibitors in auf Kollagen aktivierten Zellen untersucht.

5.6.2. Ergebnisse

5.6.2.1. Sensitivierung von MCF-7-sc- und MCF-7- β 1-kd-Zellen auf Kollagen gegenüber CDDP oder MX durch Inhibitoren des MAPK-Signalweges

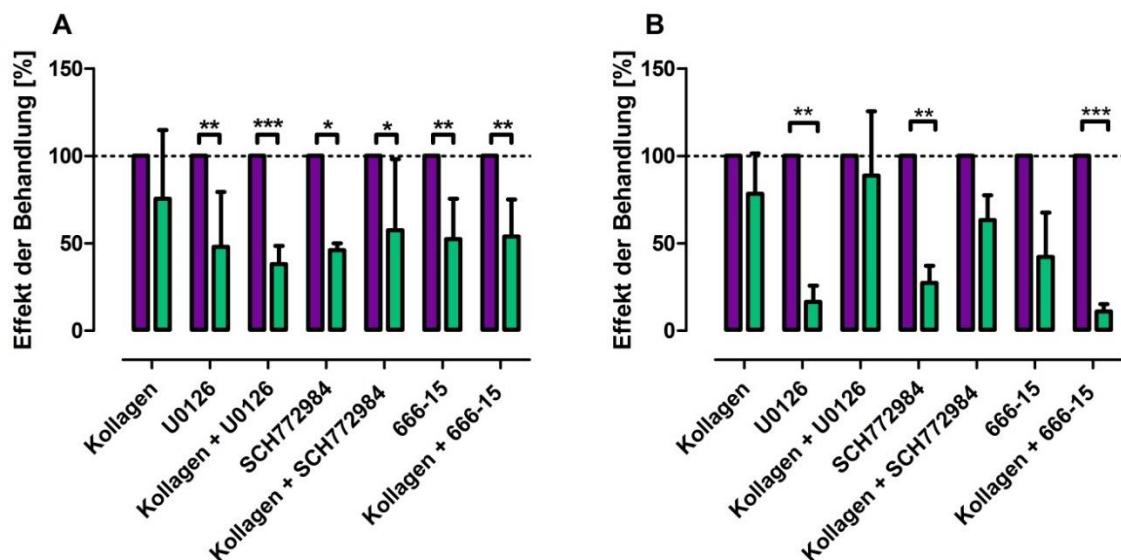


Abbildung 60: Dargestellt ist der Effekt der Behandlung in [%], also die verbleibende Vitalität der MCF-7- β 1-kd- (grün) gegenüber den MCF-7-sc-Zellen (lila) unter **A)** CDDP und **B)** MX mit den jeweiligen Inkubationsansätzen. Beide Zelllinien wurden entweder mit dem MEK-Inhibitor U0126 [5 μ M], dem ERK-Inhibitor SCH772984 [250 nM], oder dem CREB-Inhibitor 666-15 [100 nM], alleine, oder in Kombination mit Kollagen inkubiert. Die Daten wurden freundlicherweise von Herrn Fabian Baltes für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Abbildung 60 A stellt die relativen Verhältnisse [%] der einzelnen Behandlungen zueinander dar, hier als „Effekt der Behandlung“ bezeichnet. Sie gibt also an, um wieviel Prozent effektiver die Inhibitoren in den MCF-7- β 1-kd-Zellen ansprechen, als in den MCF-7-sc-Zellen. Im Gegensatz zu den vorherigen Zytotoxizitätsuntersuchungen wird hier also nicht der Einfluss des β 1-knock-down auf die MCF-7 Zelllinie untersucht, sondern das Ansprechen von β 1-defizienten Zellen auf eine bestimmte Behandlung im Vergleich zum Ansprechen der MCF-7-Zelllinie (repräsentiert durch die MCF-7-sc-Zellen) auf die gleiche Behandlung.

Dieses Konzept soll zum besseren Verständnis am Kollagen exemplarisch erläutert werden. Die Betrachtung des „normalisierten RF“ zeigt, dass MCF-7- β 1-kd-Zellen gegenüber MCF-7-sc-Zellen direkt empfindlicher sind, wenn sie auf Kollagen wachsen.

Dieser Sachverhalt spiegelt sich nicht nur in den relativen, sondern auch in den absoluten Werten innerhalb jeder Messung wider. Der „Effekt der Behandlung“ hingegen sagt aus, dass MCF-7- β 1-kd-Zellen auf Kollagen, im Verhältnis zu MCF-7- β 1-kd-Zellen ohne Kollagen, empfindlicher auf das Zytostatikum reagieren, und dass dieser Effekt in den MCF-7- β 1-kd-Zellen um 20% stärker ausgeprägt ist (unter Vernachlässigung der Standardabweichung), als in den MCF-7-sc-Zellen. Um zu überprüfen, inwiefern die Deletion der β 1-Untereinheit die MCF-7-Zellen beeinflusst, sind die Werte der MCF-7-sc-Zellen immer auf 100 % festgesetzt und die MCF-7- β 1-kd-Zellen werden stets im Verhältnis zu ihrer jeweiligen MCF-7-sc-Kontrolle abgebildet.

Betrachtet man nun den Effekt verschiedener Inhibitoren des MAPK-Signalweges auf die MCF-7- β 1-kd-Zelllinie unter einer MX-Behandlung (Abbildung 60 B), so erkennt man für alle drei Inhibitoren in den MCF-7- β 1-kd ein besseres Ansprechen als in den MCF-7-sc-Zellen. Der MEK1/2-Inhibitor U0126 wirkt in den MCF-7- β 1-kd-Zellen um 80 % stärker, als in der β 1 kompetenten MCF-7-sc-Zelle. Allerdings wird dieser Effekt durch die Kultivierung auf Kollagen vollständig kompensiert. Für den ERK1/2-Inhibitor SCH772948 zeigt sich ein analoges Verhalten. Der stark ausgeprägte Effekt des Inhibitors wird durch eine Kollagenbehandlung um ca. 40 % reduziert. Der CREB-Inhibitor 666-15 nimmt hingegen eine Sonderrolle ein, da er von diesem Muster der Sensitivierung abweicht. Während der Inhibitor in MCF-7- β 1-kd-Zellen grundsätzlich gut anspricht, verglichen mit den MCF-7-sc-Zellen als Kontrolle, verstärkt sich dieser Unterschied noch einmal, wenn die Zellen auf Kollagen kultiviert werden.

Die gleichen Untersuchungen für die MCF-7- β 1-kd Zellen unter der Behandlung mit CDDP (Abbildung 60 A) demonstrieren, dass unter CDDP grundsätzlich ähnliche Effekte wie unter MX auftreten. Der Einfluss von Kollagen scheint jedoch geringer auszufallen. Betrachtet man die Inhibitoren U0126 und 666-15, so hat die Inkubation auf Kollagen keinerlei kompensatorischen Effekt. Lediglich unter SCH772984 scheint eine Kompensation des Inhibitoreffektes gegeben. Interessanterweise ist die Wirkung aller Inhibitoren relativ gesehen unter CDDP geringer ausgeprägt, als unter MX.

5.6.3. Schlussfolgerungen

In den mit CDDP versetzten Zellen zeigten alle Inhibitoren in allen Ansätzen eine hohe Wirksamkeit auf, wenn gleich geringer als in den mit MX behandelten Zellen. Die Zellen reagieren somit auf Inhibitoren sowohl des MAPK-, als auch des FAK/PI3K/Akt-*signalings* äußerst empfindlich. Dies legt nahe, dass parallel zum FAK/PI3K/Akt-Signalweg, der zuvor als Hauptvermittler der Resistenzbildung ausgemacht werden konnte, auch der MAPK-Signalweg in der Resistenzbildung gegenüber CDDP aktiv ist. Arbeiten zur CDDP-Resistenz in anderen Tumorentitäten stellen die Resistenzen gegenüber CDDP in Abhängigkeit zum MAPK-Signalweg. Dabei spielt scheinbar der Tumorsuppressor p53 in MCF-7-Zellen eine entscheidende Rolle (110). In Ovarialkarzinomzellen ist bereits gezeigt worden, wie p53, als Reaktion auf CDDP vermittelte DNS-Schäden, über ERK1/2 kontrolliert wird (341). Die hier demonstrierte Empfindlichkeit gegenüber Inhibitoren des MAPK-Signalweges könnte folglich über p53 vermittelt werden parallel zur FAK/PI3K/Akt-vermittelten-Resistenz. Eine nähere Untersuchung als Bestandteil zukünftiger Arbeiten erscheint vielversprechend.

Es ist ebenfalls vorstellbar, dass das MAPK-*signaling* mit über das FAK/PI3K/Akt-*signaling* angesteuert wird und somit durch dessen Inhibierung ebenfalls abgeschwächt wird. Dieser Synergismus konnte bereits in unterschiedlichen epithelialen Brustkrebszellen innerhalb einer Kollagenmatrix demonstriert werden. Demnach läuft die Verbindung über den FAK/Src-Komplex, sowie Shc und Grb-2 ab (342). Daneben kann aber auch eine Integrin unabhängige Aktivierung des MAPK-*signaling* über RTKs ablaufen. So konnten Studien in MCF-7-Zellen mit einem Chlorambucil-Derivat neben einer Herabregulierung der β 1-Integrin-Dichte, vor allem Deregulierungen des IGF-I Rezeptors und der von ihm gesteuerten MAP Kinasen (insbesondere ERK1/ERK2) zeigen. Interessanterweise hatte die β 1-Deregulation keinen Einfluss auf die Proteine FAK, Shc und Grb-2, welche als Link zwischen dem IGF-I Rezeptor und dem Integrin fungieren. Somit scheint eine unabhängige simultane Deregulierung stattzufinden, die sich schlussendlich in einer Herabregulierung innerhalb des MAPK-Signalweges zeigte (343). Da die β 1-defizienten Zellen weitaus empfindlicher auf die Inhibition des MAPK-Signalweges als die β 1 kompetenten Zellen reagieren, liegt die Vermutung nahe, dass der MAPK-Signalweg hier eine Rolle spielt. Da die initialen Untersuchungen

allerdings bereits gezeigt haben, dass vorrangig FAK/PI3K/Akt-*signaling* unter CDDP angesprochen wird, ist diese MAPK-Aktivität vermutlich nicht integrinabhängig vermittelt. Die Inkubation mit Kollagen hatte keinen Einfluss auf die Resistenz gegenüber den MAPK Inhibitoren. Eine Kompensierung über andere Integrine, oder weitere Kollagen bindende Rezeptoren wie den DDR1/2, scheint somit nicht stattzufinden. Es ist also davon auszugehen, dass in die Resistenzbildung gegenüber CDDP der MAPK-Signalweg parallel über RTK-regulierte Prozesse involviert ist. Folglich reagiert die Zelle auf den Verlust an $\beta 1$ in einer Art Umschaltung (*switch*), bei der nur noch der MAPK-Signalweg aktiv bleibt.

Die Resistenzbildung gegenüber MX ist hingegen viel mehr der Kompensation durch weitere kollagenbindende Rezeptoren unterworfen (*shift*), da die MCF-7- $\beta 1$ -kd-Zellen vorwiegend sensitiviert werden, wenn man sie ohne Kollagen mit den Inhibitoren behandelt. Auf Kollagen hingegen scheint immer noch eine gesteigerte Resistenzbildung vermittelt zu werden. Da die Effektivität der Inhibitoren nach Kollagen-Inkubation abnimmt, bezogen auf die ERK und MEK Inhibierung, kann angenommen werden, dass andere Rezeptoren für die $\beta 1$ -Abwesenheit kompensieren. In Frage kommen hier andere Integrine und weitere Kollagen-bindende-Rezeptoren, wie der DDR1/2. In anderen Zellen ist bereits demonstriert worden, wie unter der $\beta 1$ -Downregulation eine Hochregulierung anderer Integrine ($\beta 4$, $\beta 3$) erfolgt, was dann zu einer kompensatorischen Signalweiterleitung führte. Die kompensatorische Aktivität kann dabei an andere ECM-Substrate als Kollagen I gekoppelt sein, es ist aber auch für nicht aus $\beta 1$ -Untereinheiten aufgebauten Integrinen (z.B. $\beta 3$) eine Bindung an RGD-Motive in denaturiertem Kollagen I nachgewiesen und somit hier theoretisch denkbar. (345).

Auch eine Resistenzbildung über den DDR1/2 muss in Betracht gezogen werden und ist nicht zuletzt deswegen interessant, weil der DDR unabhängig von $\beta 1$ Integrinen die gleichen Signalprozesse ansteuern kann (196). Dazu konnten kürzlich veröffentlichte Studien zeigen, dass der DDR1 in Brustkrebszellen sowohl Einfluss auf die PI3K/Akt- als auch die ERK- vermittelte Signalweiterleitung ausübt, und dass dieser Einfluss in Abhängigkeit zum IGF-Rezeptor steht (346). Diese Befunde decken sich mit den Erkenntnissen in anderen Zelllinien, nach denen DDRs den MAPK Signalweg mitsteuern (347). Die Bindung des DDR an die Kollagen-Matrix vermittelt folglich die gleichen Signalprozesse, wie sie hier auch für die Integrine beschrieben wurden. Abbildung 61

zeigt, wie im Grundzustand sowohl parallele als auch verknüpfte Signalweiterleitungen durch Integrine und RTKs möglich sind.

Zusammengefasst zeigt Abbildung 61 die postulierte Resistenzbildung unter Einfluss von CDDP im Grundzustand (parallel) und als Reaktion auf den Wegfall eines Signalweges, indem der parallel Geschaltete für den anderen Signalweg weiter Resistenzen vermittelt (*Switch*). Die postulierte Resistenzformation unter MX hingegen tritt als Netzwerk auf, bei dem im Gegensatz zur CDDP-Resistenz eine direkte $\beta 1$ -Abhängigkeit des MAPK-Signalweges zu vermuten ist. Als Kompensation für den Wegfall eines Signalweges übernehmen hier andere kollagenbindende Rezeptoren die Funktion der $\beta 1$ -Untereinheit (*Shift*). Exemplarisch dargestellt ist dieser Mechanismus links unten in Abbildung 61, repräsentiert durch den DDR1-Rezeptor (denkbar sind aber auch Alternativen wie die Funktionsübernahme durch eine $\beta 3$ -Untereinheit). Zusätzlich sind alle Inhibitoren und ihre Zielstrukturen in Abbildung 61 links oben aufgeführt.

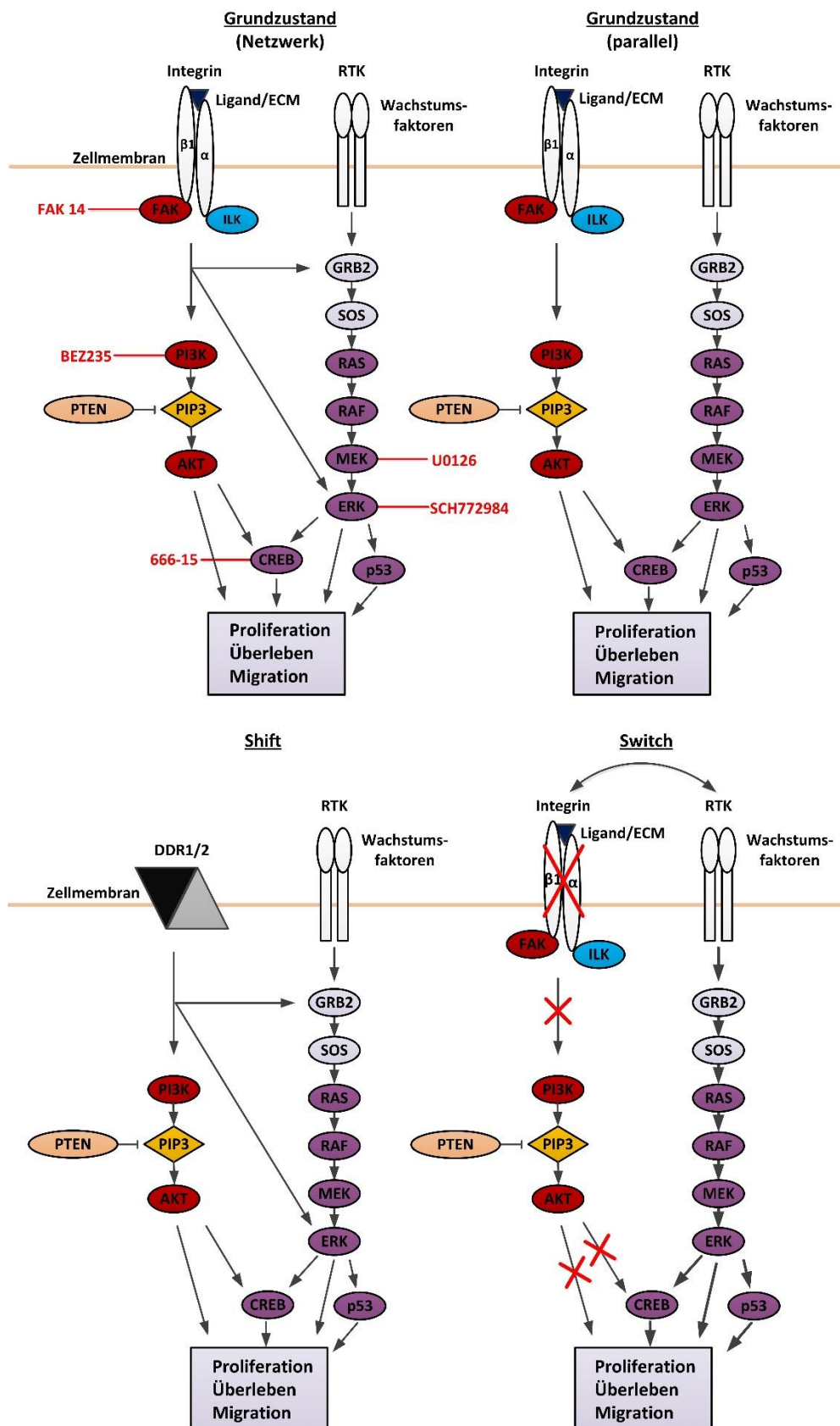


Abbildung 61: Mechanistische Kompensation der $\beta 1$ gesteuerten Resistenzbildung im Grundzustand (oben), sowie nach Manipulation der $\beta 1$ -Untereinheit (unten).

Lediglich die Inhibition von pCREB nimmt eine Sonderrolle ein, da hier kein regulierender Einfluss durch Kollagen und somit die Integrine deutlich wird. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass die pCREB auch über andere Signalmoleküle als über pERK angesteuert wird. Nichtsdestotrotz ist die Abnahme der CREB Phosphorylierung und die starke Sensitivierung der Zellen unter Einfluss von 666-15 ein interessanter Befund, der Potential für weitere Sensitivierungsstrategien birgt.

5.7. Inhibitoren und *Wnt-signaling* in MV3-Melanomzellen

5.7.1. Einleitung

Ergänzend zu den Untersuchungen in den MCF-7-Mamakarzinomzellen wurden auch die MV3-Melanomzellen mittels eines inhibitorbasierten Ansatzes untersucht. Analog zu den MCF-7-Zellen wurde hierfür mit dem *Wnt-signaling* begonnen. Als Eingangsexperiment wurde die Effektivität einer Inhibition des kanonischen Wnt-Signalweges durch den Axinstabilisator IWR1 überprüft. Die Grundannahme ist dabei, dass ein ausbleibender Effekt mit einer atypischen Aktivierung des Wnt-Signalweges einhergehen könnte. Somit wäre eine verknüpfte Aktivierung, wie sie in den MCF-7-Zellen für den MAPK-Signalweg unter MX gezeigt werden konnte, denkbar. Da MV3-Zellen und Melanomzellen generell nur schlecht auf die Behandlung mit MX ansprechen, wurde im Folgenden nur die Behandlung mit CDDP untersucht.

5.7.2. Ergebnisse

5.7.2.1. Inhibition des kanonischen Wnt-Signalweges in MV3 Melanomzellen unter dem Einfluss von CDDP durch den Inhibitor IWR1

Tabelle 12 bietet eine Übersicht über die Zytotoxizität des Inhibitors IWR1 in MV3-Melanomzellen, kultiviert für 72 h auf Kollagen unter dem Einfluss von CDDP. Die IC₅₀-Werte sind dabei aus den gemittelten pIC₅₀-Werten für alle Versuche errechnet, sowie der

daraus resultierenden RF-Wert als Quotient der Zytotoxizitäten des CDDPs in den MV3-Zellen mit IWR1, gegenüber MV3-Zellen ohne IWR1-Inkubation. Der erhöhte RF-Wert nach Zusatz von IWR1 Behandlung zeigt, dass die MV3-Zellen nicht durch den Inhibitor sensitiviert wurden.

Tabelle 12: Übersicht der Zytotoxizität des Wnt-Inhibitors IWR1; 10.000 Zellen inkubiert auf Kollagen über 72 h Inkubationszeitraum und der daraus resultierende Resistenzfaktor.

		MV3			MV3 + IWR1			
Zytostatikum	Inkubations- ansatz	pIC50		IC50 [μmol/L]	pIC50		IC50 [μmol/L]	RF
		MW	STABW		MW	STABW		
Cisplatin	Kollagen	4.83	0.16	14.8	4.62	0.07	23.9	1.61

Abbildung 62 bildet diesen Zusammenhang in einem exemplarischen Kurvenverlauf der Messungen aus Tabelle 12 ab.

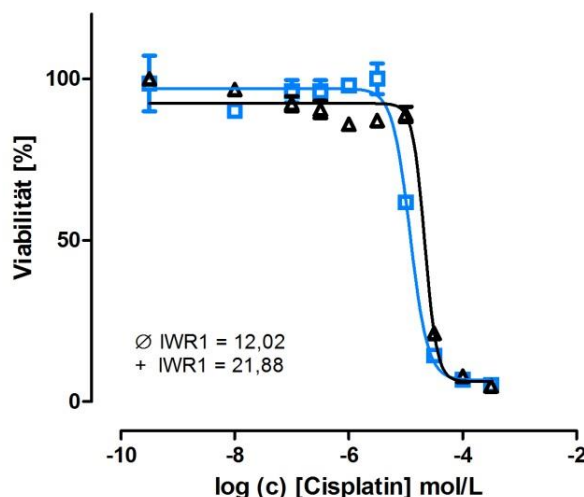


Abbildung 62: Exemplarische Messung der Zytotoxizität von IWR1 [10 μM] mit 10.000 Zellen über 72 h Inkubationszeit auf Kollagen im Vergleich MV3-Zellen ohne IWR1 (blau) und mit IWR1 (schwarz).

Zur Verdeutlichung des Effekts, werden in Abbildung 63 die aus den drei Messungen gemittelten RF-Werte der MV3-Zellen und der MV3-Zellen mit IWR1 gegenübergestellt. Die nicht mit IWR1 behandelten Zellen wurden dabei gleich 1 bzw. 100 % gesetzt. Es handelt sich folglich um das relative Verhältnis beider Behandlungen, auch hier als normalisierter RF bezeichnet.

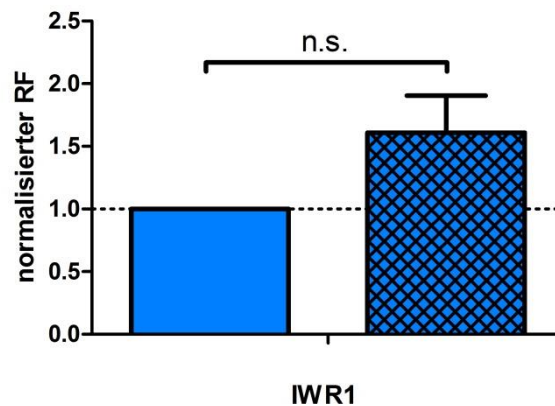


Abbildung 63: Graph der Zytotoxizität von IWR1 mit 10.000 Zellen über 72 h Inkubationszeit auf Kollagen. Dargestellt sind die gemittelten und normalisierten RF-Werte, der in Abbildung 62 exemplarisch gezeigten Replikate. MV3-Zellen auf Kollagen ohne IWR1 (blau) und auf Kollagen mit IWR1 (blau kariert).

Die Inkubation mit IWR1 ist dabei eindeutig nicht sensitivierend in den MV3-Zellen. Anschließend wurden die Zellen auf Veränderungen in der Expression von Schlüsselproteinen des Wnt-Signalweges in Abhängigkeit von Integrin-Aktivierung und CDDP untersucht.

5.7.2.2. Einfluss der Integrin-Aktivierung auf die Expression von Schlüsselproteinen des Wnt-Signalweges in MV3 Melanomzellen unter dem Einfluss von CDDP

Um den Einfluss einer Kollagen- oder Mangan (Mn^{2+})-vermittelten Integrin-Aktivierung auf das intrazelluläre *signaling* zu überprüfen, wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dabei lag der Fokus auf Proteinen des Wnt-Signalweges. Dazu zählt die pGSK3- β als Teil des *destruction-complex*, sowie Axin1 (Axin) als integraler Bestandteil dieses Komplexes. Als finales Effektorprotein des Wnt-Signalweges wurde erneut β -Catenin untersucht. In einem ersten Schritt wurden die MV3-Zellen ohne den Einfluss eines Zytostatikums vermessen (Abbildung 64), um anschließend die Effekte einer CDDP Behandlung besser abschätzen zu können (Abbildung 65).

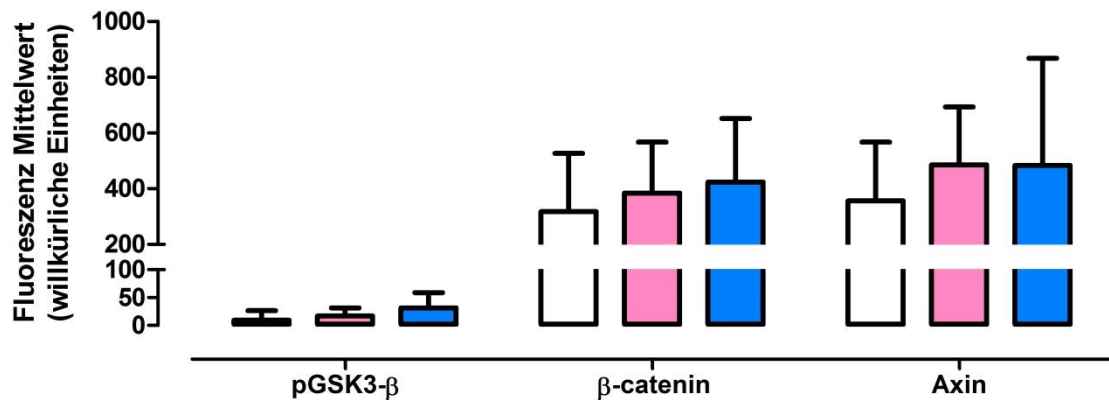


Abbildung 64: Durchflusszytometrische Bestimmung der Schlüsselproteine des Wnt-Signalweges (pGSK3-β, β-Catenin und Axin); gezeigt sind unbehandelte MV3-Zellen (weiß), MV3-Zellen mit Mn²⁺ [1 mM] vorinkubiert (rosa) und MV3-Zellen auf Kollagen gewachsen (blau) nach 72 h Inkubationszeit.

Die pGSK3-β weist insgesamt die niedrigste Grundfluoreszenz aller untersuchten Proteine auf. Ihre Konzentration ist um ein zehnfaches geringer als die Konzentrationen an β-Catenin und Axin1. Letztere scheinen innerhalb der MV3 in ungefähr gleichen Konzentrationen vorzuliegen. Inkubiert man die MV3 nun mit Mangan, nimmt die Konzentration aller untersuchten Proteine leicht zu. Diese Tendenz ist am stärksten ausgeprägt für Axin1.

Lässt man die Zellen hingegen auf Kollagen wachsen, zeigt sich für die pGSK3- β eine geringfügige Konzentrationszunahme. Für β -Catenin lässt sich derselbe Effekt beobachten, während Axin1 gegenüber den unbehandelten MV3 zwar erhöht ist, aber keinen Unterschied zu der Behandlung mit Mangan aufweist.

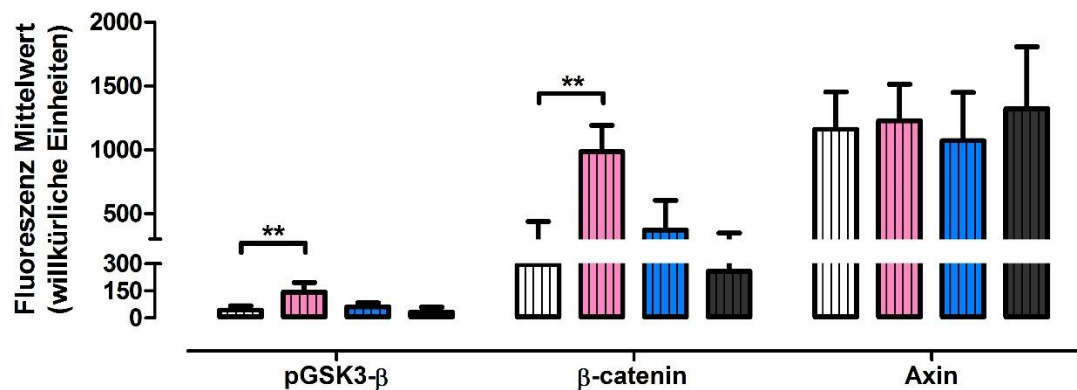


Abbildung 65: Durchflusszytometrische Bestimmung der Schlüsselproteine des Wnt-Signalweges (pGSK3- β , β -Catenin und Axin) in MV3 Zellen unter Zusatz von CDDP [7,5 μ M] ohne weitere Behandlung (weiß), Vorinkubation mit Mn²⁺ [1 mM] (rosa), MV3-Zellen auf Kollagen gewachsen (blau) oder die Kombination von Mn²⁺ und Kollagen (schwarz) nach 72 h Inkubationszeit.

Unter der Behandlung mit CDDP und der Integrin-Aktivierung durch Mangan ist eine signifikante Steigerung der pGSK3- β -Konzentration festzustellen. Die reine Behandlung mit Kollagen führt wiederum nicht zu einem signifikanten Anstieg. Die zusätzlich untersuchte Kombination aus beiden Behandlungen liegt tendenziell unter dem Ausgangsniveau der unbehandelten Zellen. Der gleiche Effekt lässt sich in der β -Catenin-Gruppe beobachten. Die Konzentrationen an β -Catenin sind signifikant erhöht in der mit Mangan behandelten Population. Sie sind damit ungefähr dreimal so hoch wie in den nur mit CDDP behandelten MV3-Zellen. Auf Kollagen kultiviert zeigt sich ebenfalls ein geringfügiger Anstieg der β -Catenin-Konzentration, während unter der kombinierten Behandlung keinerlei Effekt feststellbar ist. Die Konzentration an Axin1 ist über alle Behandlungen unverändert. Es fällt jedoch auf, dass im Vergleich zu den nicht mit CDDP behandelten MV3-Zellen (Abbildung 64) eine Steigerung der mittleren Fluoreszenz aller Behandlungsgruppen stattfindet und somit die Gesamtkonzentration an Axin1 in den mit CDDP behandelten MV3-Zellen (Abbildung 65) zunimmt.

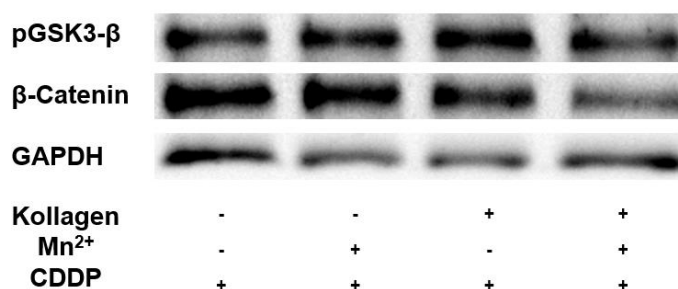


Abbildung 66: Westernblot der pGSK3-β und β-Catenin nach der Behandlung der MV3-Zellen mit CDDP [7,5 μM] mit Mn²⁺ [1 mM], Kollagen und der Kombination beider Behandlungen nach 72 h Inkubationszeit. Zusätzlich ist GAPDH als *housekeeping* Protein angegeben.

Um die Ergebnisse abzusichern wurde eine Einzelmessung pGSK3-β und des β-Catenins im Westernblot vorgenommen. Beide Proteine zeigen unter Berücksichtigung des *Housekeepings* dieselben Zunahmen unter Mangan, sowie leichte Erhöhungen unter Kollagen. Ebenfalls analog der durchflusszytometrischen Untersuchungen sind die Werte in der kombinierten Behandlung unverändert bis erniedrigt.

Um nähere Einblicke in die durch Mangan vermittelten Effekte auf die β-Catenin-Konzentration und die Lokalisation zu erhalten, wurden die Zellen zusätzlich zur vollständigen Permeabilisierung teilpermeabilisiert (4.4.5.3). Die so erhaltenen Fraktionen bilden die Gesamtmenge an β-Catenin und die zytosolische Fraktion ab. Aus ihrer Differenz ergibt sich der Anteil an zytosolischer und nukleärer Fraktion (Abbildung 67).

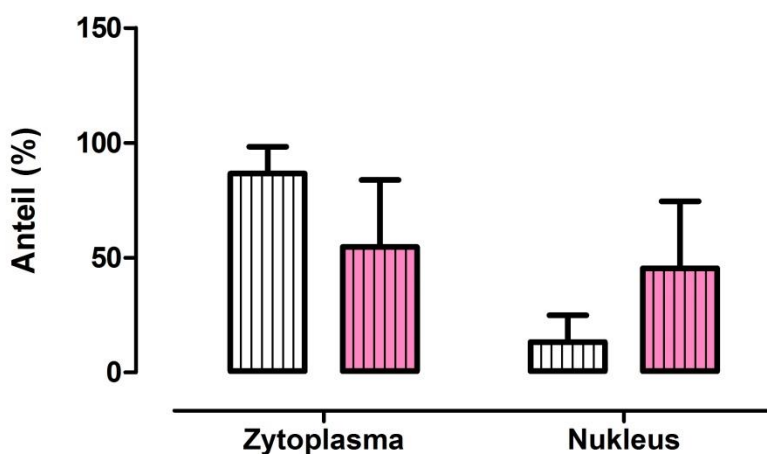


Abbildung 67: Lokalisation von β-Catenin in nur mit CDDP behandelten (weiß) und mit Mn²⁺ [1 mM] und CDDP-behandelten [7,5 μM] (rosa) MV3-Zellen nach 72 h Inkubationszeit.

Betrachtet man die Verteilung der intrazellulären β -Catenin-Konzentrationen so fällt auf, dass sich unter einem durch Mangan ausgelösten β -Catenin-Anstieg auch die Lokalisation verändert. Während in den nur mit CDDP versetzten Zellen ca. 80 % des β -Catenin zytosolisch vorliegt, schrumpft dieser Anteil in den mit Mangan vorinkubierten Zellen auf etwa 50 %. Gleichzeitig nimmt die nukleäre Fraktion um denselben Faktor zu; sie steigt also von 20 %, in den nur mit CDDP behandelten MV3-Zellen, auf ca. 50 % in den Mangan- und CDDP-vorbehandelten MV3-Zellen. Wie bereits in den MCF-7-Zellen wurden auch die MV3-Zellen bezüglich eines EMT-Markers untersucht.

5.7.2.3. Einfluss der Integrin-Aktivierung auf die Expression von E-Cadherin in MV3-Melanomzellen unter dem Einfluss von CDDP

Eine nähere Untersuchung des transmembranen Glykoproteins E-Cadherin soll daher weitere Aufschlüsse über die erhöhten Expressionslevel an β -Catenin geben. Abbildung 68 zeigt die Expression von E-Cadherin im Durchflusszytometer.

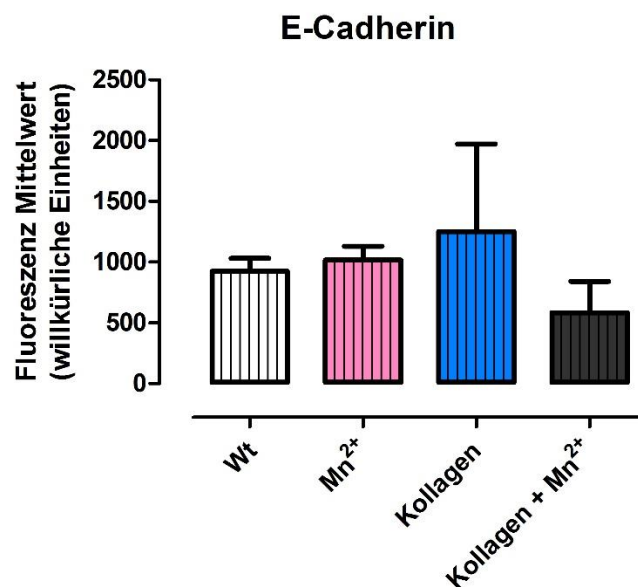


Abbildung 68: Durchflusszytometrische Bestimmung von E-Cadherin; gezeigt sind unbehandelte MV3-Zellen (weiß), MV3-Zellen mit Mn^{2+} [1 mM] vorinkubiert (rosa), MV3-Zellen auf Kollagen gewachsen (blau) und die Kombination beider Behandlungen (schwarz); Zusatz von CDDP [7,5 μ M].

Es wird deutlich, dass E-Cadherin in der durchflusszytometrischen Untersuchung keine signifikanten Unterschiede in seiner Expression aufwies. Tendenziell scheint unter

Kollagen lediglich eine geringfügige Zunahme und unter dem kombinierten Ansatz eine leichte Abnahme an E-Cadherin aufzutreten.

5.7.2.4. Einfluss unterschiedlicher Integrin-Aktivierungen auf die Aktivität des Wnt-Signalweges in MV3-Melanomzellen

Um die unter 5.7.2.2 untersuchten Veränderungen des Proteoms des Wnt-Signalweges auf Aktivitätsebene abzubilden, wurden die MV3-Zellen mit einem TCF/LEF-Reporterplasmid stabil transfiziert und im TOPflash-Assay vermessen. Dabei bildet das Reporterplasmid *firefly luciferase* in Abhängigkeit von der Aktivität des Signalweges ein Lumineszenzsignal, welches sich auslesen und quantifizieren lässt. Normalisiert man diese Werte auf die Ergebnisse einer Zellviabilitätsmessung und setzt sie in Relation zueinander, so erhält man eine Lumineszenzverteilung (Abbildung 69). Die Zellviabilitätsmessung schließt dabei aus, dass Signale unterschiedlicher Stärke durch ein vermehrtes Zellwachstum zustande kommen und somit die Luciferasesignale verfälschen können (siehe auch 4.6.3).

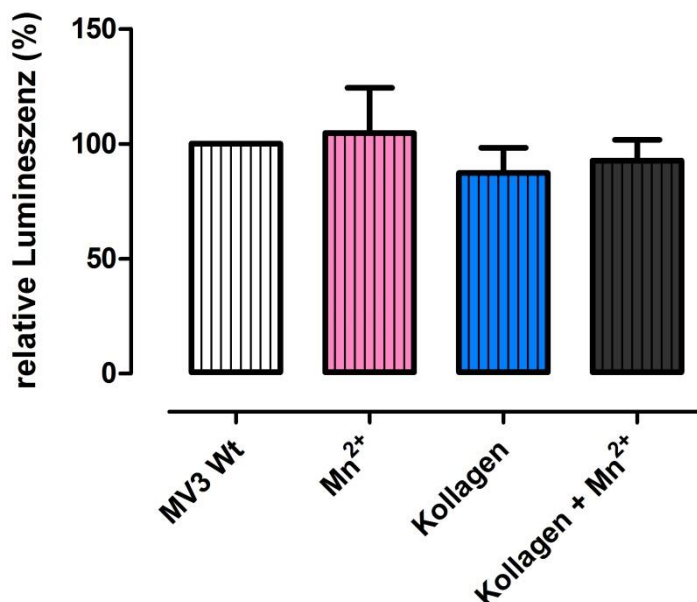


Abbildung 69: TOPflash-Assay der MV3-Melanomzellen; gezeigt sind unbehandelte MV3-Zellen (weiß), MV3-Zellen mit Mn^{2+} vorinkubiert (rosa), MV3-Zellen auf Kollagen gewachsen (blau) und die Kombination beider Behandlungen (schwarz); Zusatz von CDDP [2 μM].

Eine Ab- oder Zunahme der Wnt-Aktivität ist nur in geringem Maße zu verzeichnen. Alle Zellen wurden mit CDDP 2 μ M behandelt, um durch die subtoxische Konzentration eine Resistenzbildung/Wnt-Aktivierung anzustoßen, ohne die Zellen einem zu starken zytotoxischen Stress auszusetzen. Tendenziell scheint die Lumineszenz unter Mangan zuzunehmen, während sie unter dem Einfluss von Kollagen abnimmt. Die Kombination beider Ansätze liegt zwischen den Einzelbehandlungen in etwa auf Höhe des Ausgangsniveaus. Die Werte werden in Relation zur unbehandelten MV3-Zelle abgebildet, die als 100 % definiert ist.

5.7.3. Schlussfolgerungen

Im Gegensatz zu den MCF-7-Zellen zeigen die MV3-Zellen regulatorische Prozesse innerhalb des Wnt-Signalweges auf. Dabei diene das Initialexperiment der Überprüfung, ob der Wnt-Inhibitor IWR1, in auf Kollagen aktivierten MV3-Zellen, eine sensitivierende Wirkung besitzt. Wie die Abbildung 63 zeigt, ist dies nicht der Fall. Da IWR1 über die Stabilisierung des *destruction complex* wirkt, legen diese ersten Daten nahe, dass eine klassische über den kanonischen Wnt-Signalweg ablaufende Aktivierung nicht stattfindet und somit vermutlich als primärer Resistenzmechanismus in den MV3-Zellen ausgeschlossen werden kann. Sollte also eine Wnt-Aktivierung erfolgen, kann diese wahrscheinlich über einen alternativen Mechanismus realisiert werden. Auf Basis dieser Beobachtung wurden im nächsten Schritt die Schlüsselmoleküle des Wnt-Signalweges untersucht. Dazu zählen β -Catenin, Axin und die pGSK3- β . Im Falle einer Wnt-Aktivierung würde man wie bereits für die MCF-7-Zellen besprochen erwarten, dass die absoluten Level an β -Catenin zunehmen, bei gleichzeitiger Deaktivierung der GSK3- β durch Phosphorylierung an Ser 9 des N-terminalen Endes, während die Axin-Expression unbeeinflusst bliebe.

Betrachtet man nun die Gesamtexpression der untersuchten Proteine, zeigt sich in den Zytostatika unbehandelten Zellen kein Unterschied zwischen allen drei Behandlungsgruppen (unbehandelt, Mangan, Kollagen). Die reine Integrin-Aktivierung, ohne einen zusätzlichen zytotoxischen Einfluss hat also keine Wnt-Aktivierung zur Folge. Die Inkubation mit CDDP hingegen steigert signifikant die Phosphorylierung der GSK3- β an Ser 9. Bei gleichzeitiger Vorinkubation mit Mangan und in derselben Inkubationsgruppe (CDDP/Mangan) ist in logischer Konsequenz auch die zelluläre

β -Catenin-Expression signifikant erhöht. Hinzu kommt, dass sich tendenziell auch eine Delokalisierung des β -Catenin-Pools vom Zytoplasma in den Nukleus zeigt, was auf eine Aktivitätssteigerung der Expression von Wnt-Zielgenen hindeutet und somit die Integrin-Aktivierung mit der Resistenzbildung verknüpft. Die Axin-Expression bleibt wie erwartet unbeeinflusst und bestätigt die IWR1-Beobachtungen, da eine nicht vorhandene Überexpression Rückschlüsse darauf zulässt, dass die Erhöhung der pGSK3- β und des β -Catenin nicht mit einer Erhöhung des kanonischen Wnt-*signalings* verbunden sind (348).

Zusammen genommen deuten die Daten auf eine Wnt-Aktivierung in den mit Mangan behandelten Zellen hin. Vom Standpunkt der Integrine betrachtet bedeutet übt somit die pure Bindung der ECM (Kollagen-Behandlung) keinen Einfluss auf Komponenten des Wnt-*signalings* aus und auch der kombinierte Ansatz aus ECM (Kollagen) und Mangan bleibt effektivlos. Es stellt sich die Frage, welchen gesonderten Effekt Mangan vermitteln kann, der eine Wnt-Beeinflussung zur Folge hat und der nicht durch Kollagen in diesem Ausmaß vermittelt werden kann.

Dabei bieten sich prinzipiell zwei Konzepte als Erklärungsansatz an. Zum einen, eine über Mangan vermittelte *signaling*-Wirkung und zum anderen, eine durch Mangan forcierte Integrin-Clusterung in deren Folge es zu einem Verlust an Zell-Zell-Kontakten und einer E-Cadherin-Delokalisierung innerhalb der Zelle kommt.

Hinsichtlich des erstgenannten Konzeptes, ist beispielsweise bekannt, dass als Ergebnis der Bindung von Mangan über die Metallbindungsstellen der Integrine neben der Induktion des hoch affinen Bindungszustandes und der Bildung von fokalen Adhäsionskomplexen (Clustern) auch Prozesse des intrazellulären *signalings* angestoßen werden können (349). Dafür spricht auch die Arbeit von Dormond et al. wo gezeigt ist, wie sowohl die PI3K, als auch die Akt von einer Mangan-Inkubation beeinflusst werden können. Die Arbeit beweist, dass die Aktivierung mit Mangan zu einer schnellen zellulären Antwort führt, in deren Folge Akt an Ser 473 phosphoryliert wird. Diese Phosphorylierungsstelle gilt dabei als aktivierend für die Funktionen der Akt. Gleichzeitig zeigten die Untersuchungen, wie essentiell die Expression der PI3K für die Affinitätsausbildung der Integrine ist. Eine in diesem Zusammenhang logisch erscheinende FAK Phosphorylierung bleibt jedoch aus (350).

Diese Beobachtungen lassen also eine Stimulierung des Integrin-signalings durch Mangan vermuten, was bei einer Verknüpfung mit weiteren Signalwegen zu einer, wie in den Ergebnissen beobachteten, Veränderungen des Wnt-Signalwegs führen kann. Wir konnten analog zu diesen Befunden in der Publikation von Piva et al. für die MV3-Zellen nachweisen, dass sich die Phosphorylierung der PI3K und der Akt unter Mangan gleich den Untersuchungen von Dormond et al. verhält. Vor allem die PI3K wurde verstärkt exprimiert und phosphoryliert. Eine verstärkte FAK Involvierung unter Mangan hingegen war nicht erkennbar (331). Die Analogie dieser Befunde bekräftigt die Hypothese einer Verschaltung des klassischen Integrin-signalings mit Komponenten des Wnt-signalings. Abbildung 70 zeigt diesen postulierten Modellmechanismus für die Vermittlung Mangan-induzierter und integrinvermittelter CAM-DR-Phänomene in MV3-Zellen.

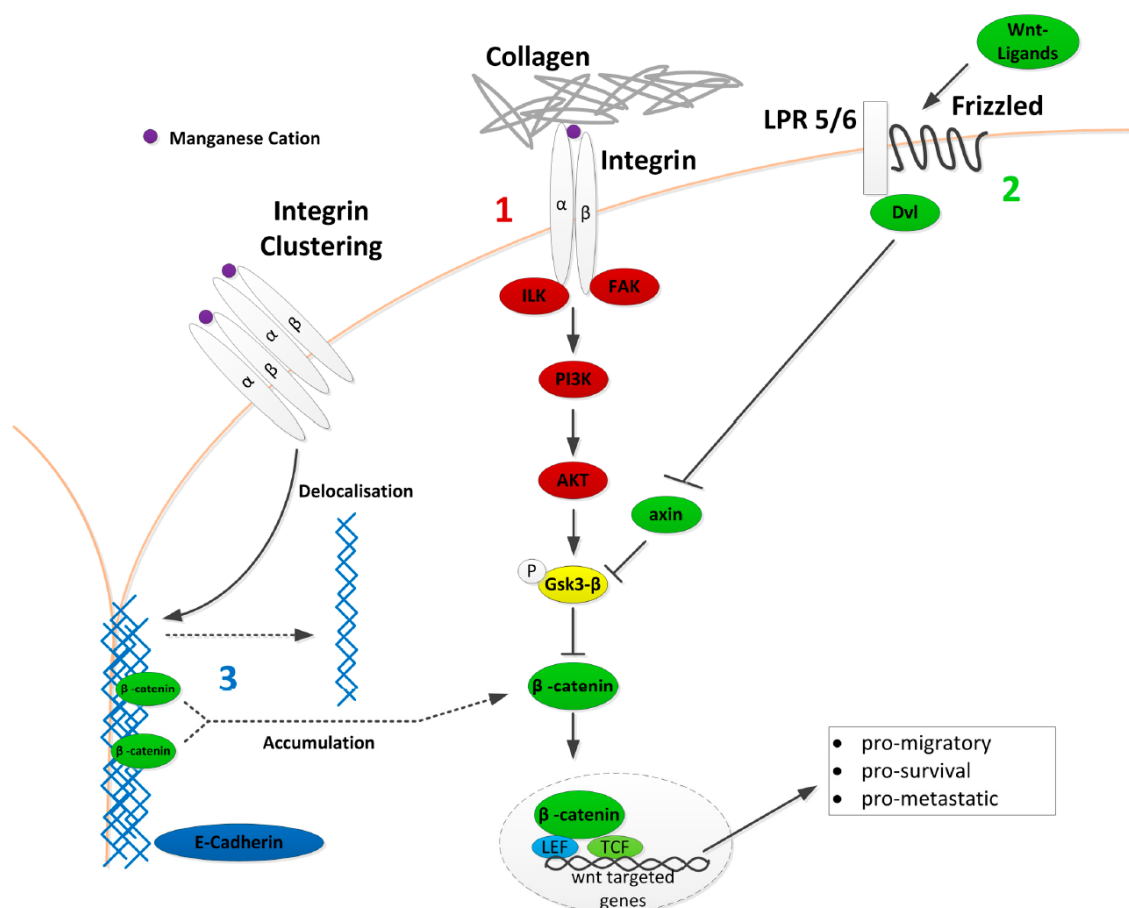


Abbildung 70: Vernetzung der an der integrinvermittelten Resistenzbildung beteiligten Signalwege. In Rot (1) dargestellt der PI3K/Akt-Signalweg, in Grün (2) der kanonische Wnt-Signalweg und in Blau (3) die E-Cadherin vermittelte β-Catenin Freisetzung. Aus Piva et al. (331).

In rot ist die klassische Integrin-*signaling* Kaskade abgebildet, in der hier die PI3K und Akt, als Folge einer Integrin-Stimulation durch Mangan aktiviert wurden. Da eine FAK Involvierung vermutlich ausgeschlossen werden muss, ist hier zusätzlich eine alternative Aktivierung über die ILK abgebildet. Diese Aktivierung der PI3K und Akt führt wiederum zu einer Deaktivierung der GSK3- β an Ser 9, wie sie in den MV3-Zellen detektiert wurde. In grün dargestellt ist der kanonische Wnt-Signalweg der u.a. über Axin als Komponente des *destruction complex* gesteuert wird. Axin erwies sich als unverändert und somit nicht an der Aktivitätssteigerung beteiligt. IWR1 vermittelt seine Wirkung ebenfalls über die in grün gekennzeichnete Signalachse.

In blau ist eine Delokalisation von E-Cadherin als Folge einer Integrin-Clusterung beschrieben. Dieser Mechanismus ist hier als Folge des Verlustes von Zell-Zell-Kontakten abgebildet und entspricht dem zweiten Konzept einer Mangan-vermittelten Wirkung. Er konnte bereits in einer Studie von Burkhalter et al. bestätigt werden. Diese Arbeit verknüpft die Aktivierung des Wnt-*signaling* als Folge einer Integrin-Clusterung mit der Internalisation von E-Cadherin, wodurch an E-Cadherin gebundenes β -Catenin freigesetzt wird. Der Prozess ging einher mit der Deaktivierung der GSK3- β , einer Translokation von β -Catenin in den Nukleus und der Aktivierung der TCF/LEF gesteuerten Transkription (283). Allerdings wurden diese Befunde im Gegensatz zu den hier vorgenommenen Überlegungen nicht in den Kontext der CAM-DR gesetzt.

Betrachtet man die beiden Konzepte abschließend näher, muss vor allem detaillierter auf die Rolle der GSK3- β als verbindendes Element der beiden Signalwege eingegangen werden. Zwar ist eine Akt-vermittelte Inhibierung der GSK3- β an Ser 9 über zahlreiche Prozesse möglich, diese Deaktivierung beeinträchtigt aber nicht die Funktion des *destruction complex*. Deutlich wird das, wenn man die die Aktivierung der Akt über den Insulinrezeptor betrachtet. Dieser Prozess ist zwar dazu in der Lage die GSK3- β an Ser 9 zu phosphorylieren, hat aber nachweislich keinen Einfluss auf die Funktionalität des *destruction complex*. Eine Beeinflussung des Wnt-*signaling* über den Insulinrezeptor ist also nicht bekannt (241). In Konsequenz hat die Phosphorylierung der GSK3- β an Ser 9 keinen direkten Einfluss auf die Aktivität des an Axin gebundenen Pools an GSK3- β und folglich auch nicht auf den *destruction complex* selbst. Es bleibt also offen, wie die Integrinaktivierung über Mangan und die nachweislich darauffolgende Hochregulierung

des PI3K/Akt-*signalings* und die Phosphorylierung der GSK3- β an Ser 9 Einfluss auf Komponenten des Wnt-*signalings* nehmen können.

Im scheinbaren Widerspruch dazu stehen die Ergebnisse einzelner Studien, die im Zusammenhang mit einer Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges eine Deaktivierung der pGSK3- β beobachteten, mit dem Resultat, dass sich β -Catenin stabilisiert. Sharma et al. konnten zeigen, dass in Prostatakarzinomzellen die Inhibierung der PI3K mittels Inhibitor zu einer geringeren Akt-Aktivierung und verminderter GSK3- β -Deaktivierung führten. Darüber hinaus nahm die β -Catenin-Dichte nach der Inhibierung der PI3K sowohl im Zytosol als auch im Nukleus ab. Die negative Regulation der PI3K über PTEN führte ebenfalls zu einer Abnahme der β -Catenin vermittelten Aktivität (hier diente die über den Androgenrezeptor vermittelte Aktivität als *Readout*) (351). Im Einklang mit diesen Ergebnissen konnte eine Studie in Osteoblasten Zusammenhänge nachweisen zwischen der $\alpha 5 \beta 1$ Bindung an synthetische Peptide, welche die Bindung an Fibronektin simulieren und einer Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges mit einhergehender Steigerung der Wnt-Aktivität (352).

Die vermeintliche Diskrepanz dieser und unserer Befunde, bezogen auf die Funktion der GSK3- β im Kontext der Wnt-Aktivität, macht eine wissenschaftliche Untersuchung und Erörterung umso wichtiger. Dabei gibt es unterschiedliche Erklärungsansätze die im Folgenden näher erläutert und in Abbildung 71 illustriert werden.

Eine mögliche Erklärung für das Auftreten GSK3- β vermittelter Effekte nach der Phosphorylierung an Ser 9 ist die Hypothese, dass eine vermehrte Phosphorylierung zwar keinen Einfluss auf die Aktivität der GSK3- β innerhalb des *destruction complexes* besitzt, die Phosphorylierung aber den freien Pool an der, dem *destruction complex* zur Verfügung stehenden GSK3- β stark reduziert und somit eine indirekte Inhibition stattfindet (Abbildung 71 Mechanismus 1). Diesem Argument entgegen steht die Tatsache, dass die im *destruction complex* lokalisierte Menge an GSK3- β verhältnismäßig gering ist, und man somit davon ausgeht, dass dieser gebundene Pool zusätzlich durch den Strukturbildner Axin vor äußeren Einflüssen geschützt wird (353). Interessanter erscheint daher die Vielseitigkeit der durch die GSK3- β vermittelten Funktionen, die auch indirekt Einfluss auf die β -Catenin-Verfügbarkeit und Expression nehmen können.

Bereits gezeigt werden konnte ein Zusammenhang sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zwischen der GSK3- β -Deaktivierung an Ser 9 und der vermehrten Expression an β -Catenin und SNAIL (354). Beide regulieren als Cofaktoren die E-Cadherin-Expression (Abnahme) und können unterstützend wirken in der Einleitung und Durchführung einer EMT (355). Abbildung 71 zeigt unter Mechanismus 2 den Ablauf dieses Vorgangs. Alternativ kann die GSK3- β auch direkten Einfluss auf E-Cadherin selbst ausüben, da die Phosphorylierung von E-Cadherin durch die GSK3- β zu einer starken Bindungssteigerung gegenüber zytosolischem β -Catenin führen kann (Abbildung 71 Mechanismus 3). Somit steht der Zelle weniger β -Catenin zur Verfügung für andere Signalingprozesse (278). Durch die Phosphorylierung an Ser 9 und die Deaktivierung der GSK3- β ist im Umkehrschluss eine verminderte Bindung zwischen E-Cadherin und β -Catenin möglich, was β -Catenin wiederum für andere Prozesse zur Verfügung stellt.

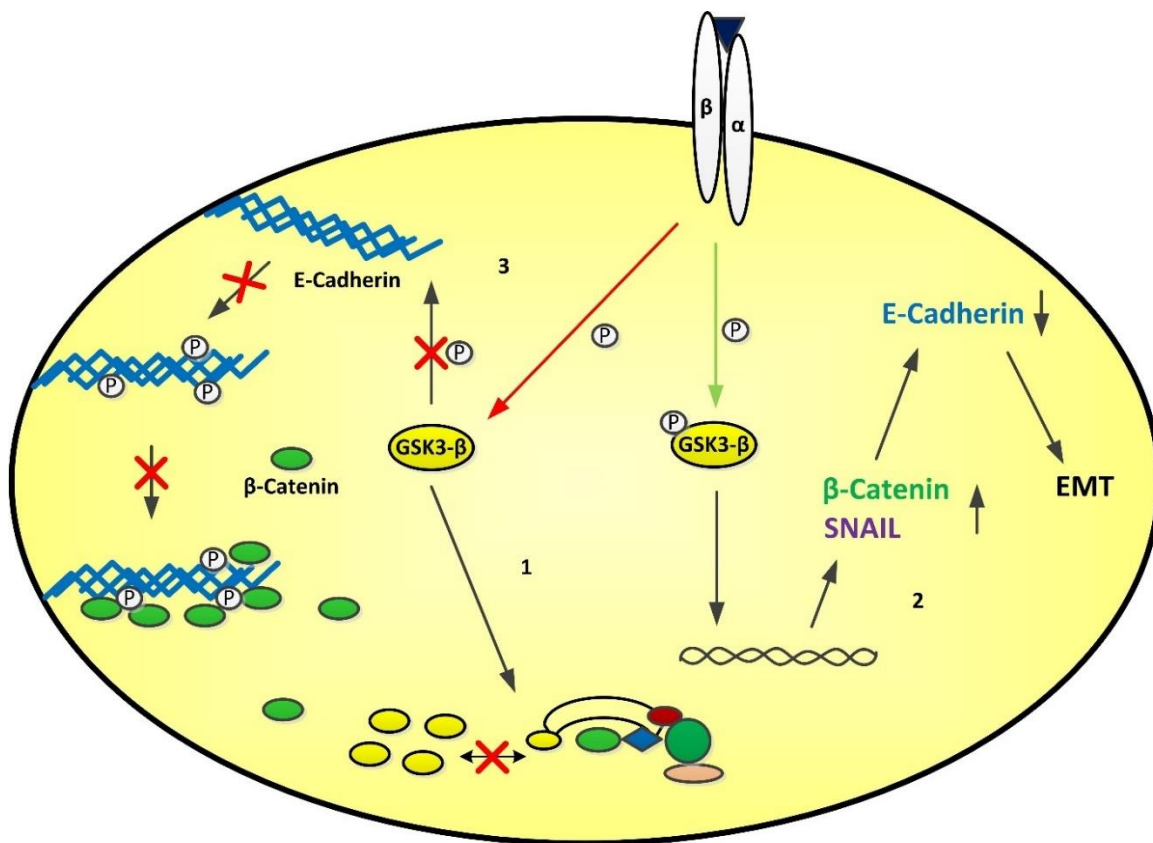


Abbildung 71: Modellmechanismen der über die Phosphorylierung an Ser 9 der GSK3- β vermittelten Beeinflussung des Wnt-Signalweges. Unter 1 dargestellt ist die Verarmung der Zelle an aktiver GSK3- β und dadurch indirekter Inhibition des *destruction complexes*. Unter 2 ist die Beeinflussung der E-Cadherin Expression über Veränderungen auf Transkriptionsebene gezeigt und unter 3 die Vermittlung von β -Catenin/E-Cadherin-Bindungen über die GSK3- β . Die roten Markierungen (Pfeil und Kreuze) zeigen dabei ein Ausbleiben der Interaktion an, während der grüne Pfeil eine steigernde Wirkung anzeigt.

Die Untersuchungen der Gesamtexpression von E-Cadherin in den MV3-Zellen, wie in Abbildung 68 gezeigt, verdeutlichen, dass sich die Expression innerhalb der Behandlungsgruppen nicht unterscheidet. Somit erscheint eine EMT-Einleitung unwahrscheinlich (Mechanismus 2). Da aber die Gesamtexpression an E-Cadherin untersucht wurde und nicht die Lokalisation innerhalb der Zelle, kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass Teile des im Zytoskelett verankerten E-Cadherins in das Zytosol übergehen. Somit ist ein unterstützender Effekt durch eine E-Cadherin-vermittelte β -Catenin-Freisetzung möglich, wenn auch unwahrscheinlich. Naheliegender ist die Vermutung, einer PI3K/Akt-vermittelten Inhibierung der GSK3- β , die zu einer indirekten Steigerung des zytosolischen und nukleären β -Catenins über den dritten Mechanismus führt. Somit existiert eine theoretische und logische Verknüpfung der beobachteten Verschaltung zwischen Integrin- und Wnt-*signaling*, die erklären könnte, warum die Phosphorylierung der GSK3- β durch die Akt Einfluss auf β -Catenin in den MV3-Zellen nimmt.

Um abschließend beurteilen zu können, ob die hier beschriebenen Veränderungen auch auf der Transkriptionsebene detektierbar sind, wurden die MV3-Zellen mit einem TCF/LEF-Reporter-Plasmid transfiziert und die Aktivitätssteigerung der Wnt-Zielgene vermessen. Überraschenderweise zeigte sich im TOP/Flash-Assay keine Veränderung auf der Transkriptionsebene. Damit liegt der Gedanke nahe, dass die beobachteten Veränderungen innerhalb des Proteoms der MV3-Zellen nicht die Resistenzbildung erklären können. Das Ausbleiben einer Aktivitätssteigerung auf der Transkriptionsebene kann jedoch auch auf andere Mechanismen zurückgeführt werden.

Auf der mechanistischen Ebene betrachtet ist die Transkription durch TCF/LEF einem komplexen Regulierungsvorgang unterworfen. So kann die Bindung von TCF an die Promotorregion sowohl inhibierend als auch stimulierend wirken, abhängig davon, welche weiteren Transkriptionsfaktoren vorliegen und welche intrazellulären Signalkaskaden aktiv sind (253). Die Bindung von β -Catenin an TCF könnte auch zu einer Repression der Transkription bestimmter Zielgene führen und dadurch andere pro-tumorigene Prozesse anstoßen, die jedoch nicht den TCF/LEF-Reporter aktivieren. Darüber hinaus müssen zukünftige Arbeiten zeigen, ob neben der Lokalisation des β -Catenin auch die Phosphorylierungsmuster des β -Catenin verändert sind, um genaue

Rückschlüsse auf die Bindung zu spezifischen Transkriptionsfaktoren ziehen zu können (356).

Zusammenfassend lässt sich für die MV3-Zellen eine über Mangan ausgelöste PI3K/Akt-Aktivierung festhalten, die wiederum die GSK3- β über Ser 9 deaktiviert, bei gleichzeitiger Akkumulation von β -Catenin. Es scheint dabei sehr wahrscheinlich, dass diese Vorgänge indirekt über die Phosphorylierung von E-Cadherin einander bedingen und somit PI3K/Akt-*signaling* und Wnt-*signaling* miteinander verbinden. Im Kontext der erhöhten Resistenzwerte könnte folglich das Vorliegen der Verbindung zweier resistenzvermittelnder Signalwege als Zielstruktur für verschiedene neue Sensitivierungsstrategien dienen. Es bleibt jedoch zu überprüfen, wie sich ein solcher Ansatz auf Aktivitäts- und vor allem Funktionalitätsebene bewährt. Erste Ansätze in triple-negativen Brustkrebszellen haben bereits gezeigt, wie eine Kombination aus Inhibitoren der PI3K und des Wnt-Signalweges hoch effektiv sein kann (357). Während hier jedoch eine kompensatorische Wnt-Aktivierung nach PI3K-Inhibition ausgenutzt wurde, könnte sich in Melanomzellen eine verstärkt synergistische Wirkung einstellen, mit deren Hilfe sich die CAM-DR-Bildung überwinden ließe.

Insofern bietet sich auch für die MV3-Zellen eine Untersuchung bezüglich der Auswirkungen eines β 1-*knock-down* auf die zuvor gezeigten Zusammenhänge an.

5.8. Ergänzende Untersuchungen an der MV3-kd-Zelllinie

5.8.1. Einleitung

Die an den MV3-Melanomzellen durchgeführten Messungen zum Wnt-Signalweg wurden also auch an der MV3- β 1-kd-Mutante durchgeführt. Dabei wurde untersucht, inwiefern der *knock-down* der β 1-Untereinheit die Expression der pGSK3- β , dem β -Catenin, Axin1 und E-Cadherin beeinflusst.

5.8.2. Ergebnisse

5.8.2.1. Einfluss der Integrin-Aktivierung auf die Expression von Schlüssel-proteinen des Wnt-Signalweges in MV3- β 1-kd-Melanomzellen unter dem Einfluss von CDDP

Abbildung 72 zeigt die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung aller vier Proteine des Wnt-Signalweges in den MV3- β 1-kd-Zellen. Auf eine Untersuchung der Kombination aus Kollagen und Mangan wurde verzichtet, da sich in den MV3-Zellen unter dieser Behandlung keinerlei interessante Effekte verzeichnen ließen.

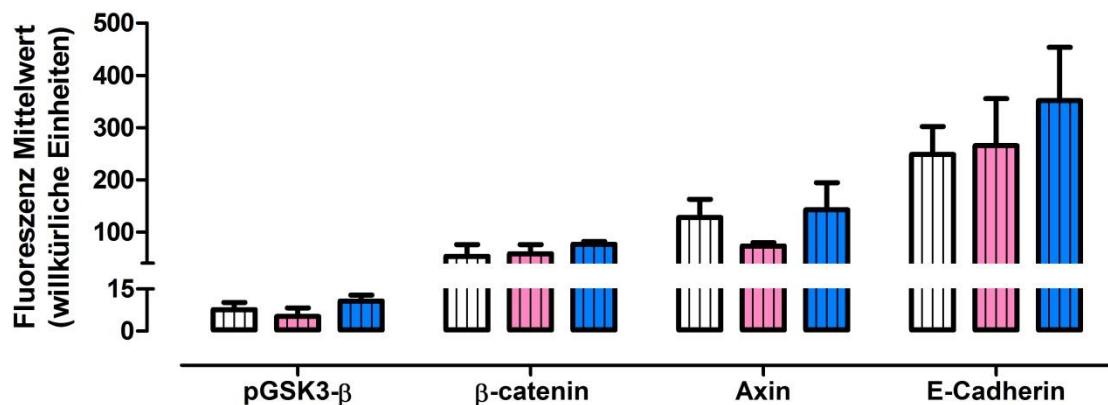


Abbildung 72: Durchflusszytometrische Bestimmung der Schlüsselproteine des Wnt-Signalweges (pGSK3- β , β -Catenin und Axin); gezeigt sind unbehandelte MV3- β 1-kd-Zellen (weiß), MV3- β 1-kd-Zellen mit Mn²⁺ [1 mM] vorinkubiert (rosa) und MV3- β 1-kd-Zellen auf Kollagen gewachsen (blau); Zusatz von CDDP [7,5 μ M] (längsgestreift) nach 72 h Inkubationszeit.

Es zeigt sich, dass die Mangan-Behandlung in der MV3- β 1-kd-Zelle nicht mehr zu einem signifikanten Anstieg der GSK3- β -Phosphorylierung führt. Die leichte, aber nicht signifikante Erhöhung nach der Inkubation auf Kollagen bleibt jedoch bestehen. Auch für β -Catenin wird kein Einfluss der Mangan-Behandlung deutlich. Die β -Catenin-Konzentration bleibt für alle Behandlungen auf konstant gleichem Level. Betrachtet man nun Axin1 (in MV3- β 1-kd- und MV3-sc-Zellen als n=2 gezeigt), so zeigt sich eine deutliche Abnahme unter der Einwirkung von Mangan, verglichen mit den unbehandelten und den auf Kollagen kultivierten MV3- β 1-kd-Zellen, die beide auf gleichem Niveau liegen. Abschließend wurde E-Cadherin untersucht, das in den unbehandelten und den Mangan-behandelten Zellen gleich stark exprimiert ist, während sich unter Kollagen eine Zunahme abzeichnet.

Da für eine Transfektion/Transduktion eine Kontrollmutante zur Überprüfung des Einflusses der Genomeditierung nötig ist, wurden zusätzlich die Experimente der nativen MV3-Zellen (Abbildung 65 und Abbildung 68) an der MV3-sc-Zelle wiederholt.

Die MV3-sc-Zelle zeigt eine Diskrepanz zu ihren nativen Ursprungszellen (Abbildung 73). Die signifikanten Zunahmen von pGSK3- β und β -Catenin in der Mangan-Behandlung ist in den MV3-sc-Zellen nicht erkennbar. β -Catenin zeigt nur noch einen geringen Anstieg, während die pGSK3- β scheinbar auf gleichem Niveau wie die unbehandelten und kollageninkubierten Zellen bleibt. Axin1 hingegen zeigt sich auch in den MV3-sc-Zellen unverändert. Dieselben Tendenzen wie in den MV3 sind zu erkennen für E-Cadherin, das unter Mn^{2+} und Kollagen ansteigt.

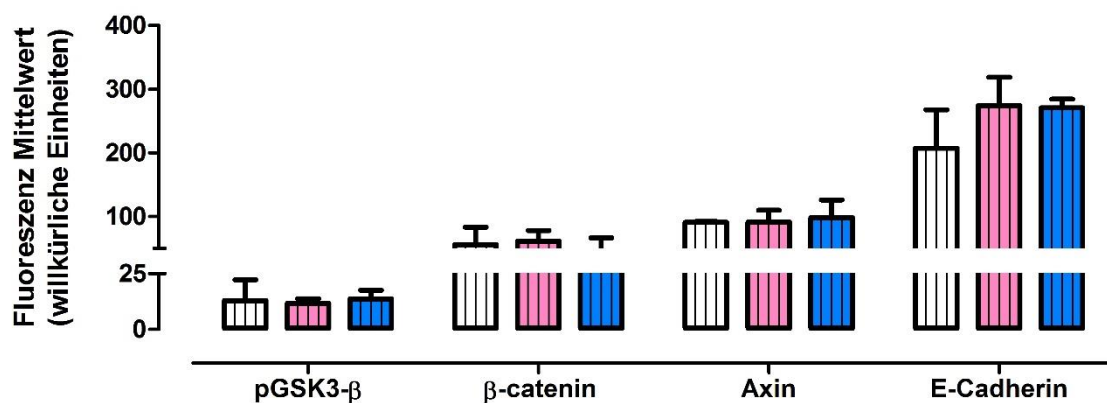


Abbildung 73: Durchflusszytometrische Bestimmung der Schlüsselproteine des Wnt-Signalweges (pGSK3- β , β -Catenin und Axin); gezeigt sind unbehandelte MV3-sc-Zellen (weiß), MV3-sc-Zellen mit Mn^{2+} [1 mM] vorinkubiert (rosa) und MV3-sc-Zellen auf Kollagen gewachsen (blau); Zusatz von CDDP [7,5 μ M] (längsgestreift) nach 72 h Inkubationszeit.

5.8.3. Schlussfolgerungen

Nach der β 1-Deregulierung ist keine Signalweiterleitung mehr über den alternativen Wnt-Signalweg erkennbar. Die MV3- β 1-kd-Zellen reagieren nicht mehr auf eine Aktivierung durch Mangan, und es bestätigt sich, dass dieser Prozess durch die β 1-Untereinheit gesteuert wird. Allerdings war in den MV3-sc-Kontrollen keine signifikante Induktion durch Mangan zu erreichen. Da jedes Forschungsmodell Limitierungen unterworfen ist, sollen diese im Folgenden kurz erläutert und eingeordnet werden, um die Ergebnisse der MV3-sc-Zellen besser gewichten zu können. Zum einen wurden die Zellen kontinuierlich in einem Puromycin-haltigen Medium kultiviert, was sie

auf der Signalebene verändern kann. So konnte bspw. gezeigt werden, dass Puromycin als Induktor von MRP1 fungiert (358). Somit könnten sich zuvor festgestellte Effekte in den MV3-Zellen nur noch abgeschwächt in den MV3-sc-Zellen manifestieren, so dass sie evtl. nicht mehr signifikant sind. Betrachtet man die Ergebnisse der MV3-sc-Zellen, erscheint ein solcher Einfluss durchaus relevant. Darüber hinaus erfolgt die Integration der transfizierten DNS zufällig in das Wirtsgenom und es kann nicht ausgeschlossen werden, dass dabei essentielle Gensequenzen für die hier beschriebenen Mechanismen betroffen sind. Diese Limitierungen gelten dabei natürlich für beide Zellsysteme und könnten auch die Ergebnisse in den $\beta 1$ -*knock-down* Zellen beeinflussen. Da die an den MCF-7-sc- und MCF-7- $\beta 1$ -kd-Zellen erzielten Ergebnisse einhergehen mit Erkenntnissen weiterer Arbeiten bzgl. morphologischer und zellulärer Charakteristiken und die Wahrscheinlichkeit einer Integration in DNS-Strukturen der untersuchten Signalwege statistisch äußerst gering ist, erscheint hier keine Einschränkung in Bezug auf die an ihnen erzielten Ergebnisse notwendig. Die MV3-sc Zellen hingegen zeigten eine unerwartet erhöhte Expression der $\beta 1$ -Untereinheit, im Vergleich mit ihren Wt-Zellen (Die Daten hierzu finden sich in der Dissertation von Frau Bethania Piva). Somit müssen die hier erzielten Ergebnisse an den MV3-sc-Zellen kritisch gesehen werden und ein Ausbleiben der erwarteten Effekte wird diesen Limitierungen zugeschrieben.

5.9. Vergleich und Auswirkungen der Befunde

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die MCF-7-Zellen sowohl über den PI3K/Akt-Signalweg als auch über den MAPK-Signalweg die CAM-DR steuern, während die MV3-Zellen über PI3K/Akt- und Wnt-*signaling* Resistenzen ausbilden. Somit zeigt eine kombinierte Inhibition der hier identifizierten Zielstrukturen (Signalwege) vielversprechende Ansätze in der Überwindung primärer Resistenzen auf.

Es scheint sinnvoll eine $\beta 1$ -Blockade in Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinomen wie den MCF-7-Zellen um einen MAPK-Inhibitor zu ergänzen, um den hier postulierten *Shift* in der Resistenzbildung zu vermeiden (MX), bzw. den simultan aktiven MAPK-Signalweg auszuschalten (CDDP), in Abhängigkeit vom eingesetzten Chemotherapeutikum. In den MV3-Zellen hingegen ist es unter Berücksichtigung der Ergebnisse dieser Arbeit sinnvoller, eine Blockade des Integrin-*signalings* um einen Inhibitor der GSK3- β oder des β -Catenin zu ergänzen. Beiden Zelllinien gemeinsam ist

bei Ansprechen auf unterschiedliche Signalwege die Tatsache, dass die der CAM-DR zugrunde liegenden Signalmechanismen nicht als singuläres Ziel zu betrachten sind. Vielmehr steuern die Integrine ein Netzwerk aus Signalmechanismen, deren Schnittpunkte und Verbindungen in den einzelnen Zellmodellen stark abweichen, aber derselben Basis, dem PI3K/Akt-*signaling*, entspringen.

In der Praxis sind erste Ansätze mit der β 1-Untereinheit als primäre Zielstruktur bereits getestet worden bspw. an Glioblastomen, die eine erhöhte β 1-Expression aufwiesen. Nach Blockierung der β 1-Untereinheit mittels des Antikörpers OS2966 zeigte sich eine stark erhöhte Effektivität des in Kombination gegebenen Angiogenesehemmers Bevacizumab (359). Dieser wirkt über die Bindung von VEGF, einem Substrat der VEGF-Rezeptoren (RTKs), welche intrazelluläre Prozesse über den MAPK-Signalweg steuern. Hieraus wird ersichtlich, wie die Blockierung zweier Signalwege wie bspw. die β 1-Blockade in Kombination mit einem MAPK- oder FAK-Inhibitor die Effektivität einer Therapie erhöhen kann.

Der Ansatz einer Multitargetingstrategie unterliegt allerdings auch Einschränkungen für deren Abschätzung ein tiefergehendes Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen unabdingbar ist. Betrachtet man die bereits durchgeführten Untersuchungen mit Kombinationen, die mehrere Inhibitoren beinhalteten, kommen wissenschaftliche Übersichtsarbeiten zu dem Schluss, dass neben einem hohen Potential an synergistisch, agonistischen Effekten auch antagonistische Interaktionen zwischen den eingesetzten Inhibitoren auftreten. Somit ist ein generalisierter Ansatz ohne Kenntnisse der mechanistischen Grundlagen mit geringen Erfolgsaussichten verbunden (360,361). Hinzu kommt aus Sicht der klinischen Pharmakologie, dass jeder weiterer Wirkstoff, der dem Patienten verabreicht wird das Risiko für Wechselwirkungen und unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAWs) steigert. Gerade in der Krebstherapie kann dabei eine nur geringfügige Veränderung pharmakokinetischer oder pharmakodynamischer Profile der eingesetzten Zytostatika durch Polymedikation zu verringerter Effektivität und erhöhter Toxizität führen. Bereits ab einer Zahl von fünf unterschiedlichen Medikamenten kommt es zwangsläufig zu nicht vorhersagbaren Interaktionen. Das Nutzen-Risiko-Verhältnis nimmt also mit jedem weiteren Wirkstoff potentiell ab, sodass genau austariert werden muss, welche Kombinationen einen Vorteil für den Patienten bieten, ohne dass die Nachteile der Kombination überwiegen (362).

Ein gezieltes Vorgehen, basierend auf Grundlagenforschungen wie in der vorliegenden Arbeit, besitzt das Potential einer Risikominimierung bei gleichzeitiger Effektivitätssteigerung der Behandlung und dass sowohl gegenüber primären Resistenzen wie der CAM-DR, als auch in der Behandlung sekundärer Resistenzen und etablierter Tumore.

6. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Phänomene der CAM-DR in Melanom- und Mammakarzinomzellen untersucht und mit einander verglichen werden. Dabei wurden neben zwei unterschiedlichen Tumorentitäten auch die zwei Zytostatika CDDP und MX bezüglich ihres Einflusses auf das intrazelluläre *signaling* untersucht. Mittels eines $\beta 1$ -*knock-down* sollten die Befunde validiert und weiter charakterisiert werden. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen sowohl Unterschiede als auch Gemeinsamkeiten der beiden Zelllinien auf und lassen sich wie in Abbildung 74 gezeigt zusammenfassen.

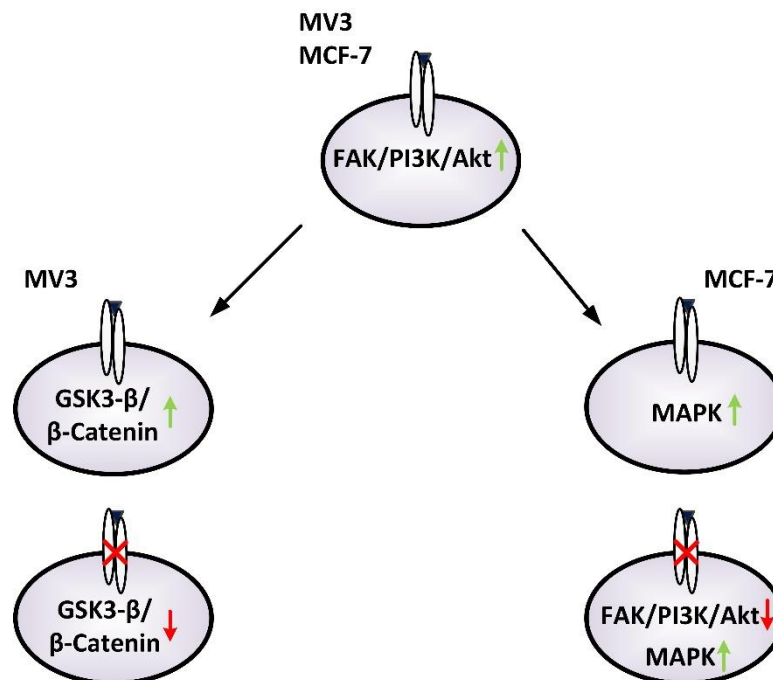


Abbildung 74: Direkter Vergleich der $\beta 1$ -vermittelten Signaleinflüsse in den MV3- und MCF-7-Zellen mit und ohne intakter $\beta 1$ -Untereinheit.

Beide Zelllinien zeigen nach Integrinaktivierung eine gemeinsame Basis in ihrer initialen *signaling*-Antwort. Sie sprechen dabei beide auf die dem Integrin direkt nachgeschalteten Signalwege der PI3K/Akt-Signalachse an und divergieren erst von dort in ihrer weiteren Verschaltung. Die $\beta 1$ -kompetenten MV3-Zellen demonstrieren eine GSK3- β abhängige Vernetzung des Wnt-Signalweges mit dem PI3K/Akt-Signalweg. Die Untersuchungen an den MV3- $\beta 1$ -kd-Zellen bestätigen, dass dieser Zusammenhang Integrin vermittelt auftritt. Somit geht die Integrin-vermittelte-Resistenzbildung in MV3-Zellen einher mit

gesteigerten β -Catenin-Leveln, als Resultat der Verschaltung beider Signalwege. Es bleibt jedoch zu klären, wie genau dieser Anstieg die verringerte Sensitivität gegenüber CDDP auf Aktivitätsebene steuert.

Die Untersuchungen an den MCF-7-Zellen hingegen demonstrieren, dass dieser Mechanismus nicht allgemeingültig ist, da sich weder für CDDP noch für MX eine Wnt-Aktivität demonstrieren ließ. Für die MCF-7-Zelllinie rückt vielmehr der MAPK-Signalweg in den Vordergrund. Dieser wird sowohl durch eine Inkubation auf Kollagen angesteuert, als auch durch Induktion des $\beta 1$ -*knock-downs* verstärkt. Dabei zeigt sich, dass CDDP als Vertreter der platinhaltigen Zytostatika eine Resistenzbildung über die Integrine hauptsächlich in Abhängigkeit von PI3K/Akt-*signaling* steuert, während weitere nicht Integrin-abhängige Signalprozesse wie das MAPK-*signaling* parallel dazu aktiv sind. Die Auswirkungen einer MX-Inkubation hingegen forcieren einen mechanistischen *Shift* zwischen dem FAK/PI3K/Akt- und dem MAPK-*signaling* als Reaktion auf den zytotoxischen Stress, der sich verstärkt zeigt nach *knock-down* der $\beta 1$ -Untereinheit.

Die hier beschriebenen Veränderungen auf der zellulären Signalebene ermöglichen somit ein tiefergehendes Verständnis des CAM-DR-Prozesses und identifizieren Verschaltungen bekannter Signalwege als Zielstrukturen in der Behandlung Zytostatika-resistenter Tumore. Moderne Ansätze mit Inhibitor-Kombinationen verschiedener molekularer Targets können diese Befunde möglicherweise in zukünftigen Therapiestrategien ausnutzen und somit die Behandlung resistenter Tumore effektivieren.

7. Anhang

7.1. Literaturverzeichnis

1. Sporn MB. The war on cancer. *The Lancet*. Mai 1996;347(9012):1377–81.
2. SEER Cancer Stat Facts [Internet]. [zitiert 12. Dezember 2018]. Verfügbar unter: <https://seer.cancer.gov/statfacts/>
3. Mäbert K, Cojoc M, Peitzsch C, Kurth I, Souchelnyskyi S, Dubrovskaya A. Cancer biomarker discovery: Current status and future perspectives. *International Journal of Radiation Biology*. August 2014;90(8):659–77.
4. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, u. a. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012: Globocan 2012. *International Journal of Cancer*. 1. März 2015;136(5):E359–86.
5. Curigliano G, Burstein HJ, Winer EP, Gnant M, Dubsky P, Loibl S, u. a. De-escalating and escalating treatments for early-stage breast cancer: the St. Gallen International Expert Consensus Conference on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2017. *Annals of Oncology*. 1. August 2017;28(8):1700–12.
6. Perez EA, Romond EH, Suman VJ, Jeong J-H, Sledge G, Geyer CE, u. a. Trastuzumab Plus Adjuvant Chemotherapy for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Positive Breast Cancer: Planned Joint Analysis of Overall Survival From NSABP B-31 and NCCTG N9831. *Journal of Clinical Oncology*. 20. November 2014;32(33):3744–52.
7. S3-Leitlinie Mammakarzinom. 2018;448.
8. Sullivan RJ, Fisher DE. Understanding the Biology of Melanoma and Therapeutic Implications. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. Juni 2014;28(3):437–53.
9. Hazlehurst LA, Dalton WS. Mechanisms associated with cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR) in hematopoietic malignancies. *Cancer Metastasis Rev*. 2001;20(1–2):43–50.
10. International Agency for Research on Cancer. Global Cancer Observatory (GCO). GLOBOCAN 2018: cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. [Internet]. 2018. Verfügbar unter: <http://gco.iarc.fr/>
11. Harbeck N, Gnant M. Breast cancer. *The Lancet*. März 2017;389(10074):1134–50.
12. Nahed AS, Shaimaa MY. Ki-67 as a prognostic marker according to breast cancer molecular subtype. *Cancer Biology & Medicine*. 2016;13(4):496.
13. Morrow M, Harris JR, Schnitt SJ. Surgical Margins in Lumpectomy for Breast Cancer — Bigger Is Not Better. *New England Journal of Medicine*. 5. Juli 2012;367(1):79–82.
14. Loibl S, Gianni L. HER2-positive breast cancer. *The Lancet*. Juni 2017;389(10087):2415–29.

15. Krag DN, Anderson SJ, Julian TB, Brown AM, Harlow SP, Costantino JP, u. a. Sentinel-lymph-node resection compared with conventional axillary-lymph-node dissection in clinically node-negative patients with breast cancer: overall survival findings from the NSABP B-32 randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. Oktober 2010;11(10):927–33.
16. Boyages J. Radiation therapy and early breast cancer: current controversies. *The Medical Journal of Australia*. 4. September 2017;207(5):216–22.
17. Bartelink H. The changing landscape in radiotherapy for breast cancer: Lessons from long term follow-up in some European breast cancer trials. *Radiotherapy and Oncology*. Dezember 2016;121(3):348–56.
18. Nordenskjöld AE, Fohlin H, Albertsson P, Arnesson LG, Chamalidou C, Einbeigi Z, u. a. No clear effect of postoperative radiotherapy on survival of breast cancer patients with one to three positive nodes: a population-based study. *Annals of Oncology*. 1. Juni 2015;26(6):1149–54.
19. NCI Dictionary of Cancer Terms [Internet]. National Cancer Institute. 2011 [zitiert 5. Februar 2019]. Verfügbar unter: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms>
20. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *The Lancet*. August 2011;378(9793):771–84.
21. Aromatase inhibitors versus tamoxifen in early breast cancer: patient-level meta-analysis of the randomised trials. *The Lancet*. Oktober 2015;386(10001):1341–52.
22. Knauer M, Filipits M, Dubsky P. Late Recurrences in Early Breast Cancer: For Whom and How Long Is Endocrine Therapy Beneficial? *Breast Care*. 2014;9(2):97–97.
23. Del Mastro L, De Placido S, Bruzzi P, De Laurentiis M, Boni C, Cavazzini G, u. a. Fluorouracil and dose-dense chemotherapy in adjuvant treatment of patients with early-stage breast cancer: an open-label, 2 × 2 factorial, randomised phase 3 trial. *The Lancet*. Mai 2015;385(9980):1863–72.
24. Moebus V, Jackisch C, Lueck H-J, du Bois A, Thomssen C, Kurbacher C, u. a. Intense Dose-Dense Sequential Chemotherapy With Epirubicin, Paclitaxel, and Cyclophosphamide Compared With Conventionally Scheduled Chemotherapy in High-Risk Primary Breast Cancer: Mature Results of an AGO Phase III Study. *Journal of Clinical Oncology*. 10. Juni 2010;28(17):2874–80.
25. McFarland DC, Naikan J, Rozenblit M, Mandeli J, Bleiweiss I, Tiersten A. Changes in Pathological Complete Response Rates after Neoadjuvant Chemotherapy for Breast Carcinoma over Five Years. *Journal of Oncology*. 2016;2016:1–5.
26. Castrellon AB, Pidhorecky I, Valero V, Raez LE. The role of carboplatin in the neoadjuvant chemotherapy treatment of triple negative breast cancer. *Oncology Reviews* [Internet]. 17. März 2017 [zitiert 4. Februar 2019];11(1). Verfügbar unter: <http://oncologyreviews.org/index.php/or/article/view/324>
27. Sevcikova K, Vertakova-Krakovska B, Spanik S. Neoadjuvant Treatment in Patients with HER2-Positive Breast Cancer. *ISRN Oncology*. 2013;2013:1–8.

28. Loibl S, Jackisch C, Schneeweiss A, Schmatloch S, Aktas B, Denkert C, u. a. Dual HER2-blockade with pertuzumab and trastuzumab in HER2-positive early breast cancer: a subanalysis of data from the randomized phase III GeparSepto trial. *Annals of Oncology*. 9. November 2016;mdw610.
29. Gnant M, Clézardin P. Direct and indirect anticancer activity of bisphosphonates: A brief review of published literature. *Cancer Treatment Reviews*. August 2012;38(5):407–15.
30. Tevaarwerk AJ, Gray RJ, Schneider BP, Smith ML, Wagner LI, Fetting JH, u. a. Survival in patients with metastatic recurrent breast cancer after adjuvant chemotherapy: Little evidence of improvement over the past 30 years. *Cancer*. 15. März 2013;119(6):1140–8.
31. Rexer BN, Arteaga CL. Intrinsic and acquired resistance to HER2-targeted therapies in HER2 gene-amplified breast cancer: mechanisms and clinical implications. *Crit Rev Oncog*. 2012;17(1):1–16.
32. Muluhngwi P, Klinge CM. Identification of miRNAs as biomarkers for acquired endocrine resistance in breast cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*. November 2017;456:76–86.
33. Possanzini M, Greco C. Stereotactic radiotherapy in metastatic breast cancer. *The Breast*. Oktober 2018;41:57–66.
34. Cardoso F, Costa A, Norton L, Senkus E, Aapro M, André F, u. a. ESO-ESMO 2nd international consensus guidelines for advanced breast cancer (ABC2). *The Breast*. Oktober 2014;23(5):489–502.
35. Carey LA, Dees EC, Sawyer L, Gatti L, Moore DT, Collichio F, u. a. The Triple Negative Paradox: Primary Tumor Chemosensitivity of Breast Cancer Subtypes. *Clinical Cancer Research*. 15. April 2007;13(8):2329–34.
36. Denkert C, Liedtke C, Tutt A, von Minckwitz G. Molecular alterations in triple-negative breast cancer—the road to new treatment strategies. *The Lancet*. Juni 2017;389(10087):2430–42.
37. Maira S-M, Pecchi S, Huang A, Burger M, Knapp M, Sterker D, u. a. Identification and Characterization of NVP-BKM120, an Orally Available Pan-Class I PI3-Kinase Inhibitor. *Molecular Cancer Therapeutics*. 1. Februar 2012;11(2):317–28.
38. Baselga J, Campone M, Piccart M, Burris HA, Rugo HS, Sahmoud T, u. a. Everolimus in Postmenopausal Hormone-Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 9. Februar 2012;366(6):520–9.
39. Giordano SH, Elias AD, Gradishar WJ. NCCN Guidelines Updates: Breast Cancer. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. Mai 2018;16(5S):605–10.
40. Turner NC, Neven P, Loibl S, Andre F. Advances in the treatment of advanced oestrogen-receptor-positive breast cancer. *The Lancet*. Juni 2017;389(10087):2403–14.
41. Bandarchi B, Jabbari CA, Vedadi A, Navab R. Molecular biology of normal melanocytes and melanoma cells. *J Clin Pathol*. August 2013;66:644–8.

42. Whiteman DC, Green AC, Olsen CM. The Growing Burden of Invasive Melanoma: Projections of Incidence Rates and Numbers of New Cases in Six Susceptible Populations through 2031. *Journal of Investigative Dermatology*. Juni 2016;136(6):1161–71.
43. Gandini S, Autier P, Boniol M. Reviews on sun exposure and artificial light and melanoma. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. Dezember 2011;107(3):362–6.
44. Berwick M, Erdei E, Hay J. Melanoma Epidemiology and Public Health. *Dermatologic Clinics*. April 2009;27(2):205–14.
45. Australian Pancreatic Cancer Genome Initiative, ICGC Breast Cancer Consortium, ICGC MML-Seq Consortium, ICGC PedBrain, Alexandrov LB, Nik-Zainal S, u. a. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*. August 2013;500(7463):415–21.
46. Oba J, Nakahara T, Abe T, Hagihara A, Moroi Y, Furue M. Expression of c-Kit, p-ERK and cyclin D1 in malignant melanoma: An immunohistochemical study and analysis of prognostic value. *Journal of Dermatological Science*. Mai 2011;62(2):116–23.
47. Wang YF, Jiang CC, Kiejda KA, Gillespie S, Zhang XD, Hersey P. Apoptosis Induction in Human Melanoma Cells by Inhibition of MEK Is Caspase-Independent and Mediated by the Bcl-2 Family Members PUMA, Bim, and Mcl-1. *Clinical Cancer Research*. 15. August 2007;13(16):4934–42.
48. Kwong LN, Davies MA. Navigating the therapeutic complexity of PI3K pathway inhibition in melanoma. *Clin Cancer Res*. 1. Oktober 2013;19(19):5310–9.
49. Garcia-Diaz A, Shin DS, Moreno BH, Saco J, Escuin-Ordinas H, Rodriguez GA, u. a. Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression. *Cell Reports*. Mai 2017;19(6):1189–201.
50. Pflugfelder/Kochs/Czeschik/Garbe/Schadendorf PDTE. S3 Leitlinie Melanom-Kurzversion. 2018;80.
51. Akbani R, Akdemir KC, Aksoy BA, Albert M, Ally A, Amin SB, u. a. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell*. Juni 2015;161(7):1681–96.
52. Hayward NK, Wilmott JS, Waddell N, Johansson PA, Field MA, Nones K, u. a. Whole-genome landscapes of major melanoma subtypes. *Nature*. 3. Mai 2017;545(7653):175–80.
53. Schadendorf D, van Akkooi ACJ, Berking C, Griewank KG, Gutzmer R, Hauschild A, u. a. Melanoma. *The Lancet*. September 2018;392(10151):971–84.
54. Eggermont AMM, Chiarion-Sileni V, Grob J-J, Dummer R, Wolchok JD, Schmidt H, u. a. Adjuvant ipilimumab versus placebo after complete resection of high-risk stage III melanoma (EORTC 18071): a randomised, double-blind, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. Mai 2015;16(5):522–30.
55. Weber J, Mandala M, Del Vecchio M, Gogas HJ, Arance AM, Cowey CL, u. a. Adjuvant Nivolumab versus Ipilimumab in Resected Stage III or IV Melanoma. *New England Journal of Medicine*. 9. November 2017;377(19):1824–35.
56. Eggermont AMM, Blank CU, Mandala M, Long GV, Atkinson V, Dalle S, u. a. Adjuvant Pembrolizumab versus Placebo in Resected Stage III Melanoma. *New England Journal of Medicine*. 10. Mai 2018;378(19):1789–801.

57. Long GV, Hauschild A, Santinami M, Atkinson V, Mandalà M, Chiarion-Sileni V, u. a. Adjuvant Dabrafenib plus Trametinib in Stage III *BRAF* -Mutated Melanoma. *New England Journal of Medicine*. 9. November 2017;377(19):1813–23.
58. Maio M, Lewis K, Demidov L, Mandalà M, Bondarenko I, Ascierto PA, u. a. Adjuvant vemurafenib in resected, *BRAF* V600 mutation-positive melanoma (BRIM8): a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. April 2018;19(4):510–20.
59. Megahed AI, Koon HB. What Is the Role of Chemotherapy in the Treatment of Melanoma? *Current Treatment Options in Oncology*. Juni 2014;15(2):321–35.
60. Zahnreich S, Mayer A, Loquai C, Grabbe S, Schmidberger H. Radiotherapy with *BRAF* inhibitor therapy for melanoma: progress and possibilities. *Future Oncol*. Januar 2016;12(1):95–106.
61. Domingues B, Lopes J, Soares P, Populo H. Melanoma treatment in review. *ImmunoTargets and Therapy*. Juni 2018;Volume 7:35–49.
62. BHATIA S, TYKODI SS, THOMPSON JA. Treatment of Metastatic Melanoma: An Overview. *Oncology (Williston Park)*. Mai 2009;23(6):488–96.
63. Damiani RM, Moura DJ, Viau CM, Caceres RA, Henriques JAP, Saffi J. Pathways of cardiac toxicity: comparison between chemotherapeutic drugs doxorubicin and mitoxantrone. *Archives of Toxicology*. September 2016;90(9):2063–76.
64. Swain SM, Whaley FS, Ewer MS. Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin: A retrospective analysis of three trials. *Cancer*. 1. Juni 2003;97(11):2869–79.
65. de Bono JS, Oudard S, Ozguroglu M, Hansen S, Machiels J-P, Kocak I, u. a. Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: a randomised open-label trial. *The Lancet*. Oktober 2010;376(9747):1147–54.
66. Onyenadum A, Gogas H, Kosmidis P, Aravantinos G, Bafaloukos D, Bacoyiannis H, u. a. Mitoxantrone Plus Gemcitabine in Pretreated Patients with Metastatic Breast Cancer. *Journal of Chemotherapy*. April 2006;18(2):192–8.
67. Magnano L, Montoto S, González-Barca E, Briones J, Sancho JM, Muntañola A, u. a. Long-term safety and outcome of fludarabine, cyclophosphamide and mitoxantrone (FCM) regimen in previously untreated patients with advanced follicular lymphoma: 12 years follow-up of a phase 2 trial. *Annals of Hematology*. April 2017;96(4):639–46.
68. Dimarco A, Gaetani M, Orezzi P, Scarpinato BM, Silvestrini R, Soldati M, u. a. „DAUNOMYCIN“, A NEW ANTIBIOTIC OF THE RHODOMYCIN GROUP. *Nature*. 15. Februar 1964;201:706–7.
69. Dubost M, Ganter P, Maral R, Ninet L, Pinnert S, Preudhomme J, u. a. RUBIDOMYCIN: A NEW ANTIBIOTIC WITH CYTOSTATIC PROPERTIES. *Cancer Chemother Rep*. September 1964;41:35–6.
70. Arcamone F, Cassinelli G, Fantini G, Grein A, Orezzi P, Pol C, u. a. Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. Reprinted

- from Biotechnology and Bioengineering, Vol. XI, Issue 6, Pages 1101-1110 (1969). Biotechnol Bioeng. 20. März 2000;67(6):704–13.
71. Zee-Cheng RKY, Cheng CC. Antineoplastic agents. Structure-activity relationship study of bis(substituted aminoalkylamino)anthraquinones. Journal of Medicinal Chemistry. März 1978;21(3):291–4.
 72. Morley JO, Furlong PJ. Synthesis and calculated properties of some 1,4-bis(amino)anthracene-9,10-diones. Organic & Biomolecular Chemistry. 2006;4(21):4005.
 73. Murdock KC, Child RG, Fabio PF, Angier RB, Wallace RE, Durr FE, u. a. Antitumor agents. 1. 1,4-Bis[(aminoalkyl)amino]-9,10-anthracenediones. J Med Chem. September 1979;22(9):1024–30.
 74. Palumbo M, Gatto B, Moro S, Sissi C, Zagotto G. Sequence-specific interactions of drugs interfering with the topoisomerase–DNA cleavage complex. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease. Juli 2002;1587(2–3):145–54.
 75. Nitiss JL. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. Nature Reviews Cancer. Mai 2009;9(5):338–50.
 76. Mueller-Planitz F, Herschlag D. DNA topoisomerase II selects DNA cleavage sites based on reactivity rather than binding affinity. Nucleic Acids Research. Juni 2007;35(11):3764–73.
 77. Capranico G, De Isabella P, Tinelli S, Bigioni M, Zunino F. Similar sequence specificity of mitoxantrone and VM-26 stimulation of in vitro DNA cleavage by mammalian DNA topoisomerase II. Biochemistry. März 1993;32(12):3038–46.
 78. Wu C-C, Li Y-C, Wang Y-R, Li T-K, Chan N-L. On the structural basis and design guidelines for type II topoisomerase-targeting anticancer drugs. Nucleic Acids Research. Dezember 2013;41(22):10630–40.
 79. Crespi MD, Ivanier SE, Genovese J, Baldi A. Mitoxantrone affects topoisomerase activities in human breast cancer cells. Biochemical and Biophysical Research Communications. April 1986;136(2):521–8.
 80. Mewes K, Blanz J, Ehninger G, Gebhardt R, Zeller KP. Cytochrome P-450-induced cytotoxicity of mitoxantrone by formation of electrophilic intermediates. Cancer Res. 1. November 1993;53(21):5135–42.
 81. Blanz J, Mewes K, Ehninger G, Proksch B, Waidelich D, Greger B, u. a. Evidence for oxidative activation of mitoxantrone in human, pig, and rat. Drug Metab Dispos. Oktober 1991;19(5):871–80.
 82. Parker BS, Cullinane C, Phillips DR. Formation of DNA adducts by formaldehyde-activated mitoxantrone. Nucleic Acids Res. 15. Juli 1999;27(14):2918–23.
 83. Kapuscinski J, Darzynkiewicz Z, Traganos F, Melamed MR. Interactions of a new antitumor agent, 1,4-dihydroxy-5,8-bis[[2-[(2-hydroxyethyl)amino]-ethyl]amino]-9,10-anthracenedione, with nucleic acids. Biochem Pharmacol. 1. Februar 1981;30(3):231–40.

84. Evison BJ, Sleebs BE, Watson KG, Phillips DR, Cutts SM. Mitoxantrone, More than Just Another Topoisomerase II Poison: MITOXANTRONE, MORE THAN JUST A TOPOISOMERASE II POISON. *Medicinal Research Reviews*. März 2016;36(2):248–99.
85. Burns CP, Haugstad BN, North JA. Membrane transport of mitoxantrone by L1210 leukemia cells. *Biochemical Pharmacology*. März 1987;36(6):857–60.
86. Regev R, Yeheskely-Hayon D, Katzir H, Eytan GD. Transport of anthracyclines and mitoxantrone across membranes by a flip-flop mechanism. *Biochemical Pharmacology*. Juli 2005;70(1):161–9.
87. Feofanov A, Sharonov S, Fleury F, Kudelina I, Nabiev I. Quantitative confocal spectral imaging analysis of mitoxantrone within living K562 cells: intracellular accumulation and distribution of monomers, aggregates, naphthoquinoline metabolite, and drug-target complexes. *Biophysical Journal*. Dezember 1997;73(6):3328–36.
88. Diah SK, Smitherman PK, Aldridge J, Volk EL, Schneider E, Townsend AJ, u. a. Resistance to mitoxantrone in multidrug-resistant MCF7 breast cancer cells: evaluation of mitoxantrone transport and the role of multidrug resistance protein family proteins. *Cancer Res*. 15. Juli 2001;61(14):5461–7.
89. Litman T, Brangi M, Hudson E, Fetsch P, Abati A, Ross DD, u. a. The multidrug-resistant phenotype associated with overexpression of the new ABC half-transporter, MXR (ABCG2). *J Cell Sci*. Juni 2000;113 (Pt 11):2011–21.
90. Morrow CS. Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1, ABCC1) Mediates Resistance to Mitoxantrone via Glutathione-Dependent Drug Efflux. *Molecular Pharmacology*. 18. Januar 2006;69(4):1499–505.
91. Huang X, Okafuji M, Traganos F, Luther E, Holden E, Darzynkiewicz Z. Assessment of histone H2AX phosphorylation induced by DNA topoisomerase I and II inhibitors topotecan and mitoxantrone and by the DNA cross-linking agent cisplatin. *Cytometry*. April 2004;58A(2):99–110.
92. Zhao H, Traganos F, Darzynkiewicz Z. Phosphorylation of p53 on Ser15 during cell cycle and caused by Topo I and Topo II inhibitors in relation to ATM and Chk2 activation. *Cell Cycle*. Oktober 2008;7(19):3048–55.
93. Aubrey BJ, Kelly GL, Janic A, Herold MJ, Strasser A. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? *Cell Death and Differentiation*. Januar 2018;25(1):104–13.
94. Müller M, Wilder S, Bannasch D, Israeli D, Lehlbach K, Li-Weber M, u. a. p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J Exp Med*. 7. Dezember 1998;188(11):2033–45.
95. Alpay K, Farshchian M, Tuomela J, Sandholm J, Aittokallio K, Siljamäki E, u. a. Inhibition of c-Abl Kinase Activity Renders Cancer Cells Highly Sensitive to Mitoxantrone. *Witt SN, Herausgeber. PLoS ONE*. 22. August 2014;9(8):e105526.
96. Hövelmann S, Beckers TL, Schmidt M. Molecular alterations in apoptotic pathways after PKB/Akt-mediated chemoresistance in NCI H460 cells. *British Journal of Cancer*. Juni 2004;90(12):2370–7.

97. Bertram J, Peacock JW, Tan C, Mui AL-F, Chung SW, Gleave ME, u. a. Inhibition of the Phosphatidylinositol 3'-Kinase Pathway Promotes Autocrine Fas-Induced Death of Phosphatase and Tensin Homologue-Deficient Prostate Cancer Cells. *Cancer Research*. 1. Mai 2006;66(9):4781–8.
98. Higby DJ, Wallace HJ, Albert D, Holland JF. Diamminodichloroplatinum in the Chemotherapy of Testicular Tumors. *Journal of Urology*. Juli 1974;112(1):100–4.
99. Rosenberg B, Vancamp L, Krigas T. INHIBITION OF CELL DIVISION IN *ESCHERICHIA COLI* BY ELECTROLYSIS PRODUCTS FROM A PLATINUM ELECTRODE. *Nature*. 13. Februar 1965;205:698–9.
100. Rosenberg B, Vancamp L, Trosko JE, Mansour VH. Platinum Compounds: a New Class of Potent Antitumour Agents. *Nature*. 26. April 1969;222(5191):385–6.
101. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol*. 5. Oktober 2014;740:364–78.
102. Goodsell DS. The Molecular Perspective: Cisplatin. *Stem Cells*. März 2006;24(3):514–5.
103. el-Khateeb M, Appleton TG, Gahan LR, Charles BG, Berners-Price SJ, Bolton AM. Reactions of cisplatin hydrolytes with methionine, cysteine, and plasma ultrafiltrate studied by a combination of HPLC and NMR techniques. *J Inorg Biochem*. Oktober 1999;77(1–2):13–21.
104. Yotsuyanagi T, Usami M, Noda Y, Nagata M. Computational consideration of cisplatin hydrolysis and acid dissociation in aqueous media: effect of total drug concentrations. *Int J Pharm*. 10. Oktober 2002;246(1–2):95–104.
105. More SS, Akil O, Ianculescu AG, Geier EG, Lustig LR, Giacomini KM. Role of the copper transporter, CTR1, in platinum-induced ototoxicity. *J Neurosci*. 14. Juli 2010;30(28):9500–9.
106. Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O, u. a. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene*. 12. April 2012;31(15):1869–83.
107. Eastman A. The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes. *Pharmacol Ther*. 1987;34(2):155–66.
108. Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer*. August 2007;7(8):573–84.
109. Esteban-Fernández D, Moreno-Gordaliza E, Cañas B, Palacios MA, Gómez-Gómez MM. Analytical methodologies for metallomics studies of antitumor Pt-containing drugs. *Metallomics*. 1. Januar 2010;2(1):19–38.
110. Basu A, Krishnamurthy S. Cellular Responses to Cisplatin-Induced DNA Damage. *J Nucleic Acids [Internet]*. 8. August 2010 [zitiert 31. Juli 2017];2010. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2929606/>
111. Miller RP, Tadagavadi RK, Ramesh G, Reeves WB. Mechanisms of Cisplatin Nephrotoxicity. *Toxins*. 26. Oktober 2010;2(11):2490–518.

112. Dilruba S, Kalayda GV. Platinum-based drugs: past, present and future. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. Juni 2016;77(6):1103–24.
113. Kalayda GV, Wagner CH, Jaehde U. Relevance of copper transporter 1 for cisplatin resistance in human ovarian carcinoma cells. *J Inorg Biochem*. November 2012;116:1–10.
114. Nakayama K. Prognostic Value of the Cu-Transporting ATPase in Ovarian Carcinoma Patients Receiving Cisplatin-Based Chemotherapy. *Clinical Cancer Research*. 15. April 2004;10(8):2804–11.
115. Ossovskaya V, Koo IC, Kaldjian EP, Alvares C, Sherman BM. Upregulation of Poly (ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP1) in Triple-Negative Breast Cancer and Other Primary Human Tumor Types. *Genes Cancer*. August 2010;1(8):812–21.
116. Rintoul RC, Sethi T. The role of extracellular matrix in small-cell lung cancer. *Lancet Oncol*. Juli 2001;2(7):437–42.
117. Sherman-Baust CA, Weeraratna AT, Rangel LBA, Pizer ES, Cho KR, Schwartz DR, u. a. Remodeling of the extracellular matrix through overexpression of collagen VI contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Cancer Cell*. April 2003;3(4):377–86.
118. Citri A, Yarden Y. EGF–ERBB signalling: towards the systems level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Juli 2006;7(7):505–16.
119. Tachtsidis A, McInnes LM, Jacobsen N, Thompson EW, Saunders CM. Minimal residual disease in breast cancer: an overview of circulating and disseminated tumour cells. *Clinical & Experimental Metastasis*. August 2016;33(6):521–50.
120. Rapanotti MC, Campione E, Spallone G, Orlandi A, Bernardini S, Bianchi L. Minimal residual disease in melanoma: circulating melanoma cells and predictive role of MCAM/MUC18/MelCAM/CD146. *Cell Death Discov*. 6. März 2017;3:17005.
121. Aguirre-Ghiso JA. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nature Reviews Cancer*. November 2007;7(11):834–46.
122. Paterlini-Brechot P, Benali NL. Circulating tumor cells (CTC) detection: Clinical impact and future directions. *Cancer Letters*. August 2007;253(2):180–204.
123. Paget S. THE DISTRIBUTION OF SECONDARY GROWTHS IN CANCER OF THE BREAST. *The Lancet*. März 1889;133(3421):571–3.
124. de Groot AE, Roy S, Brown JS, Pienta KJ, Amend SR. Revisiting Seed and Soil: Examining the Primary Tumor and Cancer Cell Foraging in Metastasis. *Molecular Cancer Research*. April 2017;15(4):361–70.
125. Hoshino A, Costa-Silva B, Shen T-L, Rodrigues G, Hashimoto A, Tesic Mark M, u. a. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*. November 2015;527(7578):329–35.
126. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch: Angiogenesis. *Nature Reviews Cancer*. Juni 2003;3(6):401–10.
127. Thiery JP. Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Reviews Cancer*. Juni 2002;2(6):442–54.

128. Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 25. November 2009;139(5):871–90.
129. Chang YS, di Tomaso E, McDonald DM, Jones R, Jain RK, Munn LL. Mosaic blood vessels in tumors: Frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 19. Dezember 2000;97(26):14608–13.
130. Seyfried TN, Huysentruyt LC. On the origin of cancer metastasis. *Crit Rev Oncog*. 2013;18(1–2):43–73.
131. Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, Kerkvliet N, Morris VL, Chambers AF, u. a. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol*. September 1998;153(3):865–73.
132. Manjili MH. Tumor Dormancy and Relapse: From a Natural Byproduct of Evolution to a Disease State. *Cancer Research*. 15. Mai 2017;77(10):2564–9.
133. Pantel K, Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade. *Nature Reviews Cancer*. Juni 2004;4(6):448–56.
134. Meads MB, Hazlehurst LA, Dalton WS. The bone marrow microenvironment as a tumor sanctuary and contributor to drug resistance. *Clin Cancer Res*. 1. Mai 2008;14(9):2519–26.
135. Eyles J, Puaux A-L, Wang X, Toh B, Prakash C, Hong M, u. a. Tumor cells disseminate early, but immunosurveillance limits metastatic outgrowth, in a mouse model of melanoma. *Journal of Clinical Investigation*. 1. Juni 2010;120(6):2030–9.
136. Schmidt-Kittler O, Ragg T, Daskalakis A, Granzow M, Ahr A, Blankenstein TJF, u. a. From latent disseminated cells to overt metastasis: Genetic analysis of systemic breast cancer progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 24. Juni 2003;100(13):7737–42.
137. Sosa MS, Bragado P, Aguirre-Ghiso JA. Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field. *Nature Reviews Cancer*. September 2014;14(9):611–22.
138. Blatter S, Rottenberg S. Minimal residual disease in cancer therapy – Small things make all the difference. *Drug Resistance Updates*. Juli 2015;21–22:1–10.
139. Di Marzo L, Desantis V, Solimando AG, Ruggieri S, Annese T, Nico B, u. a. Microenvironment drug resistance in multiple myeloma: emerging new players. *Oncotarget* [Internet]. 13. September 2016 [zitiert 29. Dezember 2018];7(37). Verfügbar unter: <http://www.oncotarget.com/fulltext/10849>
140. Meads MB, Gatenby RA, Dalton WS. Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease. *Nat Rev Cancer*. September 2009;9(9):665–74.
141. Dalton WS. The tumor microenvironment as a determinant of drug response and resistance. *Drug Resistance Updates*. Oktober 1999;2(5):285–8.
142. Sethi T, Rintoul RC, Moore SM, MacKinnon AC, Salter D, Choo C, u. a. Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer cells against apoptosis: a mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance in vivo. *Nat Med*. Juni 1999;5(6):662–8.

143. Jin H, Varner J. Integrins: roles in cancer development and as treatment targets. *British Journal of Cancer*. Februar 2004;90(3):561–5.
144. Hazlehurst LA, Enkemann SA, Beam CA, Argilagos RF, Painter J, Shain KH, u. a. Genotypic and Phenotypic Comparisons of de Novo and Acquired Melphalan Resistance in an Isogenic Multiple Myeloma Cell Line Model. *Cancer Res*. 15. November 2003;63(22):7900–6.
145. Kraus AC, Ferber I, Bachmann S-O, Specht H, Wimmel A, Gross MW, u. a. In vitro chemo- and radio-resistance in small cell lung cancer correlates with cell adhesion and constitutive activation of AKT and MAP kinase pathways. *Oncogene*. Dezember 2002;21(57):8683–95.
146. Damiano JS, Cress AE, Hazlehurst LA, Shtil AA, Dalton WS. Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines. *Blood*. 1. März 1999;93(5):1658–67.
147. Winograd-Katz SE, Fässler R, Geiger B, Legate KR. The integrin adhesome: from genes and proteins to human disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. April 2014;15(4):273–88.
148. Coppolino MG, Dedhar S. Bi-directional signal transduction by integrin receptors. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. Februar 2000;32(2):171–88.
149. Cagnet S, Faraldo MM, Kreft M, Sonnenberg A, Raymond K, Glukhova MA. Signaling events mediated by $\alpha 3\beta 1$ integrin are essential for mammary tumorigenesis. *Oncogene*. August 2014;33(34):4286–95.
150. Imanishi Y, Hu B, Jarzynka MJ, Guo P, Elishaev E, Bar-Joseph I, u. a. Angiopoietin-2 Stimulates Breast Cancer Metastasis through the 5 1 Integrin-Mediated Pathway. *Cancer Research*. 24. April 2007;67(9):4254–63.
151. Matsunaga T, Takemoto N, Sato T, Takimoto R, Tanaka I, Fujimi A, u. a. Interaction between leukemic-cell VLA-4 and stromal fibronectin is a decisive factor for minimal residual disease of acute myelogenous leukemia. *Nat Med*. September 2003;9(9):1158–65.
152. Becker PS, Kopecky KJ, Wilks AN, Chien S, Harlan JM, Willman CL, u. a. Very late antigen-4 function of myeloblasts correlates with improved overall survival for patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 22. Januar 2009;113(4):866–74.
153. Hazlehurst LA, Argilagos RF, Emmons M, Boulware D, Beam CA, Sullivan DM, u. a. Cell adhesion to fibronectin (CAM-DR) influences acquired mitoxantrone resistance in U937 cells. *Cancer Res*. 15. Februar 2006;66:2338–45.
154. Huttenlocher A, Horwitz AR. Integrins in Cell Migration. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 1. September 2011;3(9):a005074–a005074.
155. Larson RS. Primary structure of the leukocyte function-associated molecule-1 alpha subunit: an integrin with an embedded domain defining a protein superfamily. *The Journal of Cell Biology*. 1. Februar 1989;108(2):703–12.
156. Yang W, Shimaoka M, Chen J, Springer TA. Activation of integrin -subunit I-like domains by one-turn C-terminal -helix deletions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 24. Februar 2004;101(8):2333–8.

157. Zhu J, Luo B-H, Xiao T, Zhang C, Nishida N, Springer TA. Structure of a Complete Integrin Ectodomain in a Physiologic Resting State and Activation and Deactivation by Applied Forces. *Molecular Cell*. Dezember 2008;32(6):849–61.
158. Tiwari S, Askari JA, Humphries MJ, Bulleid NJ. Divalent cations regulate the folding and activation status of integrins during their intracellular trafficking. *J Cell Sci*. 15. Mai 2011;124:1672–80.
159. Orr AW, Ginsberg MH, Shattil SJ, Deckmyn H, Schwartz MA. Matrix-specific suppression of integrin activation in shear stress signaling. *Mol Biol Cell*. November 2006;17(11):4686–97.
160. Chgede R, Sheetz M. Integrin and cadherin clusters: A robust way to organize adhesions for cell mechanics. *BioEssays*. Januar 2017;39(1):e201600123.
161. Carman CV, Springer TA. Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized? *Curr Opin Cell Biol*. 2003;15(5):547–56.
162. Humphries JD, Chastney MR, Askari JA, Humphries MJ. Signal transduction via integrin adhesion complexes. *Current Opinion in Cell Biology*. Februar 2019;56:14–21.
163. Campbell ID, Humphries MJ. Integrin structure, activation, and interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. März 2011;3(3).
164. Kinashi T. Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nature Reviews Immunology*. 20. Juni 2005;5(7):546–59.
165. Takada Y, Ye X, Simon S. The integrins. *Genome Biol*. 2007;8(5):215.
166. Xiong J-P. Crystal Structure of the Extracellular Segment of Integrin alpha Vbeta 3. *Science*. 12. Oktober 2001;294(5541):339–45.
167. Luo B-H, Springer TA. Integrin structures and conformational signaling. *Curr Opin Cell Biol*. Oktober 2006;18(5):579–86.
168. Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D. Integrins. *Cell Tissue Res*. Januar 2010;339(1):269–80.
169. Ramovs V, te Molder L, Sonnenberg A. The opposing roles of laminin-binding integrins in cancer. *Matrix Biology*. Januar 2017;57–58:213–43.
170. Kuwano Y, Spelten O, Zhang H, Ley K, Zarbock A. Rolling on E- or P-selectin induces the extended but not high-affinity conformation of LFA-1 in neutrophils. *Blood*. 29. Juli 2010;116(4):617–24.
171. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*. September 2007;7(9):678–89.
172. Mitroulis I, Alexaki VI, Kourtzelis I, Ziogas A, Hajishengallis G, Chavakis T. Leukocyte integrins: Role in leukocyte recruitment and as therapeutic targets in inflammatory disease. *Pharmacology & Therapeutics*. März 2015;147:123–35.

173. Feagan BG, Rutgeerts P, Sands BE, Hanauer S, Colombel J-F, Sandborn WJ, u. a. Vedolizumab as Induction and Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis. *New England Journal of Medicine*. 22. August 2013;369(8):699–710.
174. Sandborn WJ, Feagan BG, Rutgeerts P, Hanauer S, Colombel J-F, Sands BE, u. a. Vedolizumab as Induction and Maintenance Therapy for Crohn's Disease. *New England Journal of Medicine*. 22. August 2013;369(8):711–21.
175. Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature*. 3. Mai 1984;309(5963):30–3.
176. Suzuki S, Oldberg A, Hayman EG, Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Complete amino acid sequence of human vitronectin deduced from cDNA. Similarity of cell attachment sites in vitronectin and fibronectin. *EMBO J*. Oktober 1985;4(10):2519–24.
177. Grant DS, Tashiro K-I, Segui-Real B, Yamada Y, Martin GR, Kleinman HK. Two different laminin domains mediate the differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures in vitro. *Cell*. September 1989;58(5):933–43.
178. Dong X, Yu Y, Wang Q, Xi Y, Liu Y. Interaction Mechanism and Clustering among RGD Peptides and Integrins. *Molecular Informatics*. Mai 2017;36(5–6):1600069.
179. Nieberler M, Reuning U, Reichart F, Notni J, Wester H-J, Schwaiger M, u. a. Exploring the Role of RGD-Recognizing Integrins in Cancer. *Cancers*. 4. September 2017;9(12):116.
180. Pan B, Guo J, Liao Q, Zhao Y. $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins in breast, prostate and pancreatic cancer: A novel implication (Review). *Oncology Letters* [Internet]. 16. Februar 2018 [zitiert 9. Januar 2019]; Verfügbar unter: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2018.8076>
181. Knight CG, Morton LF, Peachey AR, Tuckwell DS, Farndale RW, Barnes MJ. The collagen-binding A-domains of integrins $\alpha(1)\beta(1)$ and $\alpha(2)\beta(1)$ recognize the same specific amino acid sequence, GFOGER, in native (triple-helical) collagens. *J Biol Chem*. 7. Januar 2000;275(1):35–40.
182. Heino J. The collagen family members as cell adhesion proteins. *BioEssays*. Oktober 2007;29(10):1001–10.
183. Egeblad M, Rasch MG, Weaver VM. Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution. *Current Opinion in Cell Biology*. Oktober 2010;22(5):697–706.
184. Slattery ML, John E, Torres-Mejia G, Stern M, Lundgreen A, Hines L, u. a. Matrix Metalloproteinase Genes Are Associated with Breast Cancer Risk and Survival: The Breast Cancer Health Disparities Study. Toland AE, Herausgeber. *PLoS ONE*. 16. Mai 2013;8(5):e63165.
185. Naba A, Clauser KR, Lamar JM, Carr SA, Hynes RO. Extracellular matrix signatures of human mammary carcinoma identify novel metastasis promoters. *eLife* [Internet]. 11. März 2014 [zitiert 8. Februar 2019];3. Verfügbar unter: <https://elifesciences.org/articles/01308>
186. Pickup MW, Mouw JK, Weaver VM. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep*. Dezember 2014;15(12):1243–53.

187. Gordon MK, Hahn RA. Collagens. *Cell and Tissue Research*. Januar 2010;339(1):247–57.
188. Insights on the conformational stability of collagen. *Natural Product Reports*. 18. Januar 2002;19(1):49–59.
189. Persikov AV, Ramshaw JAM, Kirkpatrick A, Brodsky B. Electrostatic Interactions Involving Lysine Make Major Contributions to Collagen Triple-Helix Stability [†]. *Biochemistry*. Februar 2005;44(5):1414–22.
190. Bella J, Liu J, Kramer R, Brodsky B, Berman HM. Conformational Effects of Gly–X–Gly Interruptions in the Collagen Triple Helix. *Journal of Molecular Biology*. September 2006;362(2):298–311.
191. Ricard-Blum S. The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(1):a004978.
192. Kadler KE, Hill A, Canty-Laird EG. Collagen fibrillogenesis: fibronectin, integrins, and minor collagens as organizers and nucleators. *Curr Opin Cell Biol*. Oktober 2008;20(5):495–501.
193. Sundaramoorthy M, Meiyappan M, Todd P, Hudson BG. Crystal Structure of NC1 Domains: STRUCTURAL BASIS FOR TYPE IV COLLAGEN ASSEMBLY IN BASEMENT MEMBRANES. *Journal of Biological Chemistry*. 23. August 2002;277(34):31142–53.
194. Eble JA, Kassner A, Niland S, Mörgelin M, Grifka J, Grässel S. Collagen XVI Harbors an Integrin $\alpha 1\beta 1$ Recognition Site in Its C-terminal Domains. *Journal of Biological Chemistry*. 1. September 2006;281(35):25745–56.
195. Hanker AB, Estrada MV, Bianchini G, Moore PD, Zhao J, Cheng F, u. a. Extracellular Matrix/Integrin Signaling Promotes Resistance to Combined Inhibition of HER2 and PI3K in HER2 + Breast Cancer. *Cancer Research*. 15. Juni 2017;77(12):3280–92.
196. Vogel W, Brakebusch C, Fässler R, Alves F, Ruggiero F, Pawson T. Discoidin Domain Receptor 1 Is Activated Independently of $\beta 1$ Integrin. *Journal of Biological Chemistry*. 25. Februar 2000;275(8):5779–84.
197. Rammal H, Saby C, Magnien K, Van-Gulick L, Garnotel R, Buache E, u. a. Discoidin Domain Receptors: Potential Actors and Targets in Cancer. *Frontiers in Pharmacology [Internet]*. 14. März 2016 [zitiert 12. Januar 2019];7. Verfügbar unter: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fphar.2016.00055/abstract>
198. Zhang K, Corsa CA, Ponik SM, Prior JL, Piwnica-Worms D, Eliceiri KW, u. a. The collagen receptor discoidin domain receptor 2 stabilizes SNAIL1 to facilitate breast cancer metastasis. *Nature Cell Biology*. Juni 2013;15(6):677–87.
199. Nam J-M, Onodera Y, Bissell MJ, Park CC. Breast Cancer Cells in Three-dimensional Culture Display an Enhanced Radioresponse after Coordinate Targeting of Integrin $\alpha 5\beta 1$ and Fibronectin. *Cancer Research*. 1. Juli 2010;70(13):5238–48.
200. Park CC, Zhang H, Pallavicini M, Gray JW, Baehner F, Park CJ, u. a. Beta1 integrin inhibitory antibody induces apoptosis of breast cancer cells, inhibits growth, and distinguishes malignant from normal phenotype in three dimensional cultures and in vivo. *Cancer Res*. 1. Februar 2006;66(3):1526–35.

201. Morello V, Cabodi S, Sigismund S, Camacho-Leal MP, Repetto D, Volante M, u. a. β 1 integrin controls EGFR signaling and tumorigenic properties of lung cancer cells. *Oncogene*. September 2011;30(39):4087–96.
202. Honda S, Shirotani-Ikejima H, Tadokoro S, Maeda Y, Kinoshita T, Tomiyama Y, u. a. Integrin-linked kinase associated with integrin activation. *Blood*. 21. Mai 2009;113(21):5304–13.
203. Seguin L, Desgrosellier JS, Weis SM, Cheresch DA. Integrins and cancer: regulators of cancer stemness, metastasis, and drug resistance. *Trends Cell Biol*. April 2015;25(4):234–40.
204. Steglich A, Vehlow A, Eke I, Cordes N. α integrin targeting for radiosensitization of three-dimensionally grown human head and neck squamous cell carcinoma cells. *Cancer Letters*. Februar 2015;357(2):542–8.
205. Eke I. [beta]1 Integrin/FAK/cortactin signaling is essential for human head and neck cancer resistance to radiotherapy. *J Clin Invest*. 2012;122:1529–40.
206. Park CC, Zhang HJ, Yao ES, Park CJ, Bissell MJ. Beta1 integrin inhibition dramatically enhances radiotherapy efficacy in human breast cancer xenografts. *Cancer Res*. 1. Juni 2008;68(11):4398–405.
207. Shain KH, Yarde DN, Meads MB, Huang M, Jove R, Hazlehurst LA, u. a. 1 Integrin Adhesion Enhances IL-6-Mediated STAT3 Signaling in Myeloma Cells: Implications for Microenvironment Influence on Tumor Survival and Proliferation. *Cancer Research*. 20. Januar 2009;69(3):1009–15.
208. Cabodi S, Morello V, Masi A, Cicchi R, Broggio C, DiStefano P, u. a. Convergence of integrins and EGF receptor signaling via PI3K/Akt/FoxO pathway in early gene Egr-1 expression. *Journal of Cellular Physiology*. Februar 2009;218(2):294–303.
209. Zscheppang K, Kurth I, Wachtel N, Dubrovskaya A, Kunz-Schughart LA, Cordes N. Efficacy of Beta1 Integrin and EGFR Targeting in Sphere-Forming Human Head and Neck Cancer Cells. *Journal of Cancer*. 2016;7(6):736–45.
210. Hannigan GE, Leung-Hagesteijn C, Fitz-Gibbon L, Coppolino MG, Radeva G, Filmus J, u. a. Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. *Nature*. 4. Januar 1996;379(6560):91–6.
211. Tu Y, Li F, Goicoechea S, Wu C. The LIM-only protein PINCH directly interacts with integrin-linked kinase and is recruited to integrin-rich sites in spreading cells. *Mol Cell Biol*. März 1999;19(3):2425–34.
212. Sakai T, Li S, Docheva D, Grashoff C, Sakai K, Kostka G, u. a. Integrin-linked kinase (ILK) is required for polarizing the epiblast, cell adhesion, and controlling actin accumulation. *Genes Dev*. 1. April 2003;17(7):926–40.
213. Zervas CG, Gregory SL, Brown NH. Drosophila integrin-linked kinase is required at sites of integrin adhesion to link the cytoskeleton to the plasma membrane. *J Cell Biol*. 5. März 2001;152(5):1007–18.
214. Vaynberg J, Fukuda K, Lu F, Bialkowska K, Chen Y, Plow EF, u. a. Non-catalytic signaling by pseudokinase ILK for regulating cell adhesion. *Nature Communications*

-
- [Internet]. Dezember 2018 [zitiert 15. Januar 2019];9(1). Verfügbar unter: <http://www.nature.com/articles/s41467-018-06906-7>
215. Legate KR, Montañez E, Kudlacek O, Füssler R. ILK, PINCH and parvin: the tIPP of integrin signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Januar 2006;7(1):20–31.
 216. Yen C-F, Wang H-S, Lee C-L, Liao S-K. Roles of integrin-linked kinase in cell signaling and its perspectives as a therapeutic target. *Gynecology and Minimally Invasive Therapy*. August 2014;3(3):67–72.
 217. Hannigan GE, McDonald PC, Walsh MP, Dedhar S. Integrin-linked kinase: Not so ‘pseudo’ after all. *Oncogene*. Oktober 2011;30(43):4375–85.
 218. Hehlhans S, Haase M, Cordes N. Signalling via integrins: Implications for cell survival and anticancer strategies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. Januar 2007;1775(1):163–80.
 219. Schultze A, Fiedler W. Therapeutic potential and limitations of new FAK inhibitors in the treatment of cancer. *Expert Opin Investig Drugs*. 2010;19:777–88.
 220. Sulzmaier FJ, Jean C, Schlaepfer DD. FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications. *Nature Reviews Cancer*. 7. August 2014;14(9):598–610.
 221. Mitra SK, Hanson DA, Schlaepfer DD. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nature Rev Mol Cell Biol*. 2005;6:56–68.
 222. Bami-Cherrier K. FAK dimerization controls its kinase-dependent functions at focal adhesions. *EMBO J*. 2014;33:356–70.
 223. Schlaepfer DD, Mitra SK, Ilic D. Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. Juli 2004;1692(2–3):77–102.
 224. Guo W, Giancotti FG. Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Oktober 2004;5(10):816–26.
 225. Reiske HR, Kao SC, Cary LA, Guan JL, Lai JF, Chen HC. Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase in focal adhesion kinase-promoted cell migration. *J Biol Chem*. 30. April 1999;274(18):12361–6.
 226. Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills GB. Exploiting the PI3K/AKT Pathway for Cancer Drug Discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*. Dezember 2005;4(12):988–1004.
 227. Courtney KD, Corcoran RB, Engelman JA. The PI3K Pathway As Drug Target in Human Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 20. Februar 2010;28(6):1075–83.
 228. Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer*. August 2009;9(8):550–62.
 229. Ruan G-X, Kazlauskas A. Focus on Molecules: Akt (PKB). *Experimental Eye Research*. November 2011;93(5):570–1.

230. Luo J. Glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) in tumorigenesis and cancer chemotherapy. *Cancer Letters*. Januar 2009;273(2):194–200.
231. ter Haar E, Coll JT, Austen DA, Hsiao HM, Swenson L, Jain J. Structure of GSK3 β reveals a primed phosphorylation mechanism. *Nat Struct Biol*. Juli 2001;8(7):593–6.
232. Mancinelli R, Carpino G, Petrunaro S, Mammola CL, Tomaipitina L, Filippini A, u. a. Multifaceted Roles of GSK-3 in Cancer and Autophagy-Related Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017;2017:1–14.
233. He L, Zhou H, Zeng Z, Yao H, Jiang W, Qu H. Wnt/ β -catenin signaling cascade: A promising target for glioma therapy: HE ET AL. *Journal of Cellular Physiology*. März 2019;234(3):2217–28.
234. Li M, Sun X, Ma L, Jin L, Zhang W, Xiao M, u. a. SDF-1/CXCR4 axis induces human dental pulp stem cell migration through FAK/PI3K/Akt and GSK3 β / β -catenin pathways. *Scientific Reports* [Internet]. Dezember 2017 [zitiert 17. Januar 2019];7(1). Verfügbar unter: <http://www.nature.com/articles/srep40161>
235. Park GB, Kim D-J, Kim Y-S, Lee H-K, Kim CW, Hur DY. Silencing of galectin-3 represses osteosarcoma cell migration and invasion through inhibition of FAK/Src/Lyn activation and β -catenin expression and increases susceptibility to chemotherapeutic agents. *International Journal of Oncology*. Januar 2015;46(1):185–94.
236. De Toni F, Racaud-Sultan C, Chicanne G, Mas VM-D, Cariven C, Mesange F, u. a. A crosstalk between the Wnt and the adhesion-dependent signaling pathways governs the chemosensitivity of acute myeloid leukemia. *Oncogene*. 25. Mai 2006;25(22):3113–22.
237. Kim MH, Lee YJ, Kim MO, Kim JS, Han HJ. Effect of leukotriene D4 on mouse embryonic stem cell migration and proliferation: Involvement of PI3K/Akt as well as GSK-3 β / β -catenin signaling pathways. *Journal of Cellular Biochemistry*. 29. Juni 2010;111(3):686–98.
238. Persad S, A.Troussard A, McPhee TR, Mulholland DJ, Dedhar S. Tumor Suppressor Pten Inhibits Nuclear Accumulation of β -Catenin and T Cell/Lymphoid Enhancer Factor 1–Mediated Transcriptional Activation. *The Journal of Cell Biology*. 11. Juni 2001;153(6):1161–74.
239. Bader AG, Kang S, Zhao L, Vogt PK. Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nat Rev Cancer*. Dezember 2005;5(12):921–9.
240. Arend RC, Londoño-Joshi AI, Straughn JM, Buchsbaum DJ. The Wnt/ β -catenin pathway in ovarian cancer: a review. *Gynecol Oncol*. Dezember 2013;131(3):772–9.
241. Ding VW, Chen R-H, McCormick F. Differential Regulation of Glycogen Synthase Kinase 3 β by Insulin and Wnt Signaling. *Journal of Biological Chemistry*. 20. Oktober 2000;275(42):32475–81.
242. Nusse R, Varmus HE. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell*. November 1982;31(1):99–109.

243. Rijsewijk F, Schuermann M, Wagenaar E, Parren P, Weigel D, Nusse R. The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene *int-1* is identical to the segment polarity gene *wingless*. *Cell*. 14. August 1987;50(4):649–57.
244. Nusse R, Clevers H. Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell*. 1. Juni 2017;169(6):985–99.
245. Papkoff J, Rubinfeld B, Schryver B, Polakis P. Wnt-1 regulates free pools of catenins and stabilizes APC-catenin complexes. *Mol Cell Biol*. Mai 1996;16(5):2128–34.
246. Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, u. a. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature*. 22. Mai 2003;423(6938):448–52.
247. Janda CY, Waghray D, Levin AM, Thomas C, Garcia KC. Structural Basis of Wnt Recognition by Frizzled. *Science*. 6. Juli 2012;337(6090):59–64.
248. Hofmann K. A superfamily of membrane-bound O-acyltransferases with implications for wnt signaling. *Trends Biochem Sci*. März 2000;25(3):111–2.
249. Zhan T, Rindtorff N, Boutros M. Wnt signaling in cancer. *Oncogene*. März 2017;36(11):1461–73.
250. Clevers H, Nusse R. Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell*. 8. Juni 2012;149(6):1192–205.
251. Lien W-H, Fuchs E. Wnt some lose some: transcriptional governance of stem cells by Wnt/ β -catenin signaling. *Genes Dev*. 15. Juli 2014;28(14):1517–32.
252. Krausova M, Korinek V. Wnt signaling in adult intestinal stem cells and cancer. *Cellular Signalling*. März 2014;26(3):570–9.
253. Cadigan KM, Waterman ML. TCF/LEFs and Wnt signaling in the nucleus. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 1. November 2012;4(11).
254. Hikasa H, Ezan J, Itoh K, Li X, Klymkowsky MW, Sokol SY. Regulation of TCF3 by Wnt-Dependent Phosphorylation during Vertebrate Axis Specification. *Developmental Cell*. Oktober 2010;19(4):521–32.
255. Delmas V, Beermann F, Martinozzi S, Carreira S, Ackermann J, Kumasaka M, u. a. β -Catenin induces immortalization of melanocytes by suppressing p16INK4a expression and cooperates with N-Ras in melanoma development. *Genes & Development*. 15. November 2007;21(22):2923–35.
256. Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y, u. a. Control of β -catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell*. 22. März 2002;108(6):837–47.
257. Dajani R. Structural basis for recruitment of glycogen synthase kinase 3 β to the axin-APC scaffold complex. *The EMBO Journal*. 3. Februar 2003;22(3):494–501.
258. Sobrado P, Jedlicki A, Bustos VH, Allende CC, Allende JE. Basic region of residues 228–231 of protein kinase CK1 γ is involved in its interaction with axin: Binding to axin does

- not affect the kinase activity. *Journal of Cellular Biochemistry*. 1. Februar 2005;94(2):217–24.
259. Su Y, Fu C, Ishikawa S, Stella A, Kojima M, Shitoh K, u. a. APC Is Essential for Targeting Phosphorylated β -Catenin to the SCF β -TrCP Ubiquitin Ligase. *Molecular Cell*. Dezember 2008;32(5):652–61.
260. Xing Y. Crystal structure of a β -catenin/Axin complex suggests a mechanism for the β -catenin destruction complex. *Genes & Development*. 15. November 2003;17(22):2753–64.
261. Stamos JL, Weis WI. The β -Catenin Destruction Complex. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. Januar 2013 [zitiert 19. Juni 2017];5(1). Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3579403/>
262. Azzolin L, Panciera T, Soligo S, Enzo E, Bicciato S, Dupont S, u. a. YAP/TAZ Incorporation in the β -Catenin Destruction Complex Orchestrates the Wnt Response. *Cell*. Juli 2014;158(1):157–70.
263. Hartman ML, Czyz M. MITF in melanoma: mechanisms behind its expression and activity. *Cellular and Molecular Life Sciences*. April 2015;72(7):1249–60.
264. Kaur A, Webster MR, Weeraratna AT. In the Wnt-er of life: Wnt signalling in melanoma and ageing. *British Journal of Cancer*. November 2016;115(11):1273–9.
265. Damsky WE, Curley DP, Santhanakrishnan M, Rosenbaum LE, Platt JT, Gould Rothberg BE, u. a. β -Catenin Signaling Controls Metastasis in Braf-Activated Pten-Deficient Melanomas. *Cancer Cell*. Dezember 2011;20(6):741–54.
266. Tenbaum SP, Ordóñez-Morán P, Puig I, Chicote I, Arqués O, Landolfi S, u. a. β -catenin confers resistance to PI3K and AKT inhibitors and subverts FOXO3a to promote metastasis in colon cancer. *Nature Medicine*. Juni 2012;18(6):892–901.
267. Chien AJ, Moore EC, Lonsdorf AS, Kulikauskas RM, Rothberg BG, Berger AJ, u. a. Activated Wnt/ss-catenin signaling in melanoma is associated with decreased proliferation in patient tumors and a murine melanoma model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 27. Januar 2009;106(4):1193–8.
268. Gallagher SJ, Rambow F, Kumasaka M, Champeval D, Bellacosa A, Delmas V, u. a. Beta-catenin inhibits melanocyte migration but induces melanoma metastasis. *Oncogene*. April 2013;32(17):2230–8.
269. Lin SY, Xia W, Wang JC, Kwong KY, Spohn B, Wen Y, u. a. Beta-catenin, a novel prognostic marker for breast cancer: its roles in cyclin D1 expression and cancer progression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 11. April 2000;97(8):4262–6.
270. Howe LR, Brown AMC. Wnt signaling and breast cancer. *Cancer Biol Ther*. Januar 2004;3(1):36–41.
271. Geyer FC, Lacroix-Triki M, Savage K, Arnedos M, Lambros MB, MacKay A, u. a. β -Catenin pathway activation in breast cancer is associated with triple-negative phenotype but not with CTNNB1 mutation. *Modern Pathology*. Februar 2011;24(2):209–31.

272. Xu J, Prosperi JR, Choudhury N, Olopade OI, Goss KH. β -Catenin Is Required for the Tumorigenic Behavior of Triple-Negative Breast Cancer Cells. Williams BO, Herausgeber. PLOS ONE. 6. Februar 2015;10(2):e0117097.
273. El Ayachi I, Fatima I, Wend P, Alva-Ornelas JA, Runke S, Kuenzinger WL, u. a. The WNT10B network is associated with survival and metastases in chemoresistant triple-negative breast cancer. Cancer Research. 18. Dezember 2018;canres.1069.2018.
274. Zhao B, Zhao Y, Sun Y, Niu H, Sheng L, Huang D, u. a. Alterations in mRNA profiles of trastuzumab-resistant Her-2-positive breast cancer. Molecular Medicine Reports [Internet]. 7. Mai 2018 [zitiert 22. Januar 2019]; Verfügbar unter: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2018.8981>
275. Johnson JPS, Kumar P, Koulis M, Patel M, Simin K. Crucial and novel cancer drivers in a mouse model of triple-negative breast cancer. Cancer Genomics Proteomics. Juni 2014;11(3):115–26.
276. Krishnamurthy N, Kurzrock R. Targeting the Wnt/beta-catenin pathway in cancer: Update on effectors and inhibitors. Cancer Treatment Reviews. Januar 2018;62:50–60.
277. Angst BD, Marcozzi C, Magee AI. The cadherin superfamily: diversity in form and function. J Cell Sci. Februar 2001;114(Pt 4):629–41.
278. van Roy F, Berx G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. Cellular and Molecular Life Sciences. Dezember 2008;65(23):3756–88.
279. Bae G-Y, Choi S-J, Lee J-S, Jo J, Lee J, Kim J, u. a. Loss of E-cadherin activates EGFR-MEK/ERK signaling, which promotes invasion via the ZEB1/MMP2 axis in non-small cell lung cancer. Oncotarget [Internet]. 26. Dezember 2013 [zitiert 22. Januar 2019];4(12). Verfügbar unter: <http://www.oncotarget.com/fulltext/1463>
280. Nelson WJ. Convergence of Wnt, -Catenin, and Cadherin Pathways. Science. 5. März 2004;303(5663):1483–7.
281. Stemmer V, de Craene B, Berx G, Behrens J. Snail promotes Wnt target gene expression and interacts with β -catenin. Oncogene. August 2008;27(37):5075–80.
282. Yook JI, Li X-Y, Ota I, Hu C, Kim HS, Kim NH, u. a. A Wnt-Axin2-GSK3 β cascade regulates Snail1 activity in breast cancer cells. Nat Cell Biol. Dezember 2006;8(12):1398–406.
283. Burkhalter RJ, Symowicz J, Hudson LG, Gottardi CJ, Stack MS. Integrin regulation of beta-catenin signaling in ovarian carcinoma. J Biol Chem. 1. Juli 2011;286(26):23467–75.
284. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. Nat Rev Mol Cell Biol. März 2014;15(3):178–96.
285. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. J Clin Invest. 1. Juni 2009;119(6):1420–8.
286. Robinson MJ, Cobb MH. Mitogen-activated protein kinase pathways. Current Opinion in Cell Biology. April 1997;9(2):180–6.

287. Roskoski R. MEK1/2 dual-specificity protein kinases: Structure and regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Januar 2012;417(1):5–10.
288. Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Feeser WS, u. a. Identification of a Novel Inhibitor of Mitogen-activated Protein Kinase Kinase. *Journal of Biological Chemistry*. 17. Juli 1998;273(29):18623–32.
289. Wang D, Boerner SA, Winkler JD, LoRusso PM. Clinical experience of MEK inhibitors in cancer therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. August 2007;1773(8):1248–55.
290. Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochemical Journal*. 1. Oktober 2000;351(1):95–105.
291. Winters ME, Mehta AI, Petricoin EF, Kohn EC, Liotta LA. Supra-additive Growth Inhibition by a Celecoxib Analogue and Carboxyamido-triazole Is Primarily Mediated through Apoptosis. *Cancer Research*. 1. Mai 2005;65(9):3853–60.
292. Roskoski R. ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation. *Pharmacological Research*. August 2012;66(2):105–43.
293. Burotto M, Chiou VL, Lee J-M, Kohn EC. The MAPK pathway across different malignancies: A new perspective: Tissue-Specific MAPK Signaling. *Cancer*. 15. November 2014;120(22):3446–56.
294. Morris EJ, Jha S, Restaino CR, Dayananth P, Zhu H, Cooper A, u. a. Discovery of a Novel ERK Inhibitor with Activity in Models of Acquired Resistance to BRAF and MEK Inhibitors. *Cancer Discovery*. 1. Juli 2013;3(7):742–50.
295. Ichiki T. Role of cAMP Response Element Binding Protein in Cardiovascular Remodeling: Good, Bad, or Both? *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. März 2006;26(3):449–55.
296. Wen AY, Sakamoto KM, Miller LS. The Role of the Transcription Factor CREB in Immune Function. *The Journal of Immunology*. 1. Dezember 2010;185(11):6413–9.
297. Schumacher MA, Goodman RH, Brennan RG. The Structure of a CREB bZIP-Somatostatin CRE Complex Reveals the Basis for Selective Dimerization and Divalent Cation-enhanced DNA Binding. *Journal of Biological Chemistry*. 10. November 2000;275(45):35242–7.
298. Zheng W, Wang H, Zeng Z, Lin J, Little PJ, Srivastava LK, u. a. The possible role of the Akt signaling pathway in schizophrenia. *Brain Research*. August 2012;1470:145–58.
299. Wang H, Xu J, Lazarovici P, Quirion R, Zheng W. cAMP Response Element-Binding Protein (CREB): A Possible Signaling Molecule Link in the Pathophysiology of Schizophrenia. *Frontiers in Molecular Neuroscience* [Internet]. 30. August 2018 [zitiert 24. Januar 2019];11. Verfügbar unter: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnmol.2018.00255/full>
300. Schaefer K-L, Brachwitz K, Wai DH, Braun Y, Diallo R, Korsching E, u. a. Expression Profiling of t(12;22) Positive Clear Cell Sarcoma of Soft Tissue Cell Lines Reveals

-
- Characteristic Up-Regulation of Potential New Marker Genes Including *ERBB3*. Cancer Research. 15. Mai 2004;64(10):3395–405.
301. Wu D, Zhau HE, Huang W-C, Iqbal S, Habib FK, Sartor O, u. a. cAMP-responsive element-binding protein regulates vascular endothelial growth factor expression: implication in human prostate cancer bone metastasis. Oncogene. August 2007;26(35):5070–7.
 302. Chhabra A, Fernando H, Watkins G, Mansel R, Jiang W. Expression of transcription factor CREB1 in human breast cancer and its correlation with prognosis. Oncology Reports [Internet]. 1. Oktober 2007 [zitiert 24. Januar 2019]; Verfügbar unter: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.18.4.953>
 303. E. L, M. M, M. C, T. M, T. T, H.M. S. NNK activates ERK1/2 and CREB/ATF-1 via β -1-AR and EGFR signaling in human lung adenocarcinoma and small airway epithelial cells. International Journal of Cancer. 1. Oktober 2006;119(7):1547–52.
 304. Park YG, Nesterova M, Agrawal S, Cho-Chung YS. Dual Blockade of Cyclic AMP Response Element- (CRE) and AP-1-directed Transcription by CRE-transcription Factor Decoy Oligonucleotide: GENE-SPECIFIC INHIBITION OF TUMOR GROWTH. Journal of Biological Chemistry. 15. Januar 1999;274(3):1573–80.
 305. Xiao X, Li BX, Mitton B, Ikeda A, Sakamoto KM. Targeting CREB for Cancer Therapy: Friend or Foe. Current Cancer Drug Targets. 1. Juni 2010;10(4):384–91.
 306. Xie F, Li BX, Kassenbrock A, Xue C, Wang X, Qian DZ, u. a. Identification of a Potent Inhibitor of CREB-Mediated Gene Transcription with Efficacious in Vivo Anticancer Activity. Journal of Medicinal Chemistry. 25. Juni 2015;58(12):5075–87.
 307. Gorden A, Osman I, Gai W, He D, Huang W, Davidson A, u. a. Analysis of BRAF and N-RAS mutations in metastatic melanoma tissues. Cancer Res. 15. Juli 2003;63(14):3955–7.
 308. Sullivan RJ, LoRusso PM, Flaherty KT. The Intersection of Immune-Directed and Molecularly Targeted Therapy in Advanced Melanoma: Where We Have Been, Are, and Will Be. Clinical Cancer Research. 1. Oktober 2014;19(19):5283–91.
 309. Roesch A. Tumor heterogeneity and plasticity as elusive drivers for resistance to MAPK pathway inhibition in melanoma. Oncogene. Juni 2015;34(23):2951–7.
 310. Johannessen CM, Johnson LA, Piccioni F, Townes A, Frederick DT, Donahue MK, u. a. A melanocyte lineage program confers resistance to MAP kinase pathway inhibition. Nature. Dezember 2013;504(7478):138–42.
 311. Wong DJ, Robert L, Atefi MS, Lassen A, Avarappatt G, Cerniglia M, u. a. Antitumor activity of the ERK inhibitor SCH722984 against BRAF mutant, NRAS mutant and wild-type melanoma. Molecular Cancer. 2014;13(1):194.
 312. Dillon LM, Bean JR, Yang W, Shee K, Symonds LK, Balko JM, u. a. P-REX1 creates a positive feedback loop to activate growth factor receptor, PI3K/AKT and MEK/ERK signaling in breast cancer. Oncogene. Juli 2015;34(30):3968–76.
 313. Kümler I, Tuxen MK, Nielsen DL. A systematic review of dual targeting in HER2-positive breast cancer. Cancer Treatment Reviews. März 2014;40(2):259–70.

314. de Azambuja E, Holmes AP, Piccart-Gebhart M, Holmes E, Di Cosimo S, Swaby RF, u. a. Lapatinib with trastuzumab for HER2-positive early breast cancer (NeoALTTO): survival outcomes of a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial and their association with pathological complete response. *The Lancet Oncology*. September 2014;15(10):1137–46.
315. Carey LA, Berry DA, Cirincione CT, Barry WT, Pitcher BN, Harris LN, u. a. Molecular Heterogeneity and Response to Neoadjuvant Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Targeting in CALGB 40601, a Randomized Phase III Trial of Paclitaxel Plus Trastuzumab With or Without Lapatinib. *Journal of Clinical Oncology*. 20. Februar 2016;34(6):542–9.
316. Giltmane JM, Balko JM. Rationale for targeting the Ras/MAPK pathway in triple-negative breast cancer. *Discov Med*. Mai 2014;17(95):275–83.
317. van Muijen GN, Jansen KF, Cornelissen IM, Smeets DF, Beck JL, Ruiter DJ. Establishment and characterization of a human melanoma cell line (MV3) which is highly metastatic in nude mice. *Int J Cancer*. 22. April 1991;48(1):85–91.
318. Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. A Human Cell Line From a Pleural Effusion Derived From a Breast Carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 1. November 1973;51(5):1409–16.
319. Brandes LJ, Hermonat MW. Receptor status and subsequent sensitivity of subclones of MCF-7 human breast cancer cells surviving exposure to diethylstilbestrol. *Cancer Res*. Juni 1983;43(6):2831–5.
320. Huguet EL, McMahon JA, McMahon AP, Bicknell R, Harris AL. Differential expression of human Wnt genes 2, 3, 4, and 7B in human breast cell lines and normal and disease states of human breast tissue. *Cancer Res*. 15. Mai 1994;54(10):2615–21.
321. OMNI Life Science GmbH & Co. KG. CASY Cell Counter and Analyzer-Label-free cell status monitoring, instantly. [Internet]. Copyright © 2016 OLS OMNI Life Science GmbH & Co KG.; [zitiert 29. Mai 2017]. Verfügbar unter: http://cellcounting.de/wp-content/uploads/2014/06/CASY_CellCounter-Analyzer_OLS.pdf
322. Walker JM. The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. *Methods Mol Biol*. 1994;32:5–8.
323. Thermo Fisher Scientific Inc. Pierce™ BCA Protein Assay Kit, User Guide [Internet]. © 2013 Thermo Fisher Scientific Inc.; [zitiert 7. Juni 2017]. Verfügbar unter: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011430_Pierce_BCA_Protein_Assay_UG.pdf
324. Lottspeich F, Engels JW, Herausgeber. *Bioanalytik*. 3., [aktualisierte und erw.] Aufl. Berlin: Springer Spektrum; 2012. 1201 S.
325. Gürtler A, Kunz N, Gomolka M, Hornhardt S, Friedl AA, McDonald K, u. a. Stain-Free technology as a normalization tool in Western blot analysis. *Anal Biochem*. 15. Februar 2013;433(2):105–11.
326. Thermo Fisher Scientific. Fluorescence SpectraViewer - DE [Internet]. [zitiert 9. Februar 2019]. Verfügbar unter: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html>
327. Sack U, Herausgeber. *Zelluläre Diagnostik und Therapie*. Berlin: De Gruyter; 2016. 426 S.

328. Barbosa CMV, Bincoletto C, Barros CC, Ferreira AT, Paredes-Gamero EJ. PLC γ 2 and PKC Are Important to Myeloid Lineage Commitment Triggered by M-SCF and G-CSF. *Journal of Cellular Biochemistry*. Januar 2014;115(1):42–51.
329. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1–2):55–63.
330. Berridge MV, Tan AS. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys*. Juni 1993;303(2):474–82.
331. Piva MBR, Jakubzig B, Bendas G. Integrin Activation Contributes to Lower Cisplatin Sensitivity in MV3 Melanoma Cells by Inducing the Wnt Signalling Pathway. *Cancers (Basel)*. 16. September 2017;9(9).
332. Jakubzig B, Baltes F, Henze S, Schlesinger M, Bendas G. Mechanisms of Matrix-Induced Chemoresistance of Breast Cancer Cells—Deciphering Novel Potential Targets for a Cell Sensitization. *Cancers*. 6. Dezember 2018;10(12):495.
333. Steen HC, Gamero AM. STAT2 phosphorylation and signaling. *JAK-STAT*. 16. Oktober 2013;2(4):e25790.
334. O'Reilly S, Ciechomska M, Fullard N, Przyborski S, van Laar JM. IL-13 mediates collagen deposition via STAT6 and microRNA-135b: a role for epigenetics. *Scientific Reports [Internet]*. Juli 2016 [zitiert 7. März 2019];6(1). Verfügbar unter: <http://www.nature.com/articles/srep25066>
335. Kolev VN, Tam WF, Wright QG, McDermott SP, Vidal CM, Shapiro IM, u. a. Inhibition of FAK kinase activity preferentially targets cancer stem cells. *Oncotarget [Internet]*. 16. Juni 2017 [zitiert 28. Juli 2017]; Verfügbar unter: <http://www.oncotarget.com/fulltext/18517>
336. Muszyńska A, Wolczyński S, Pałka J. The mechanism for anthracycline-induced inhibition of collagen biosynthesis. *Eur J Pharmacol*. 5. Januar 2001;411(1–2):17–25.
337. Hou S, Isaji T, Hang Q, Im S, Fukuda T, Gu J. Distinct effects of β 1 integrin on cell proliferation and cellular signaling in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Sci Rep*. 5. Januar 2016;6:18430.
338. Wang F, Hansen RK, Radisky D, Yoneda T, Barcellos-Hoff MH, Petersen OW, u. a. Phenotypic reversion or death of cancer cells by altering signaling pathways in three-dimensional contexts. *J Natl Cancer Inst*. 2. Oktober 2002;94(19):1494–503.
339. Menendez JA, Vellon L, Mehmi I, Teng PK, Griggs DW, Lupu R. A novel CYR61-triggered „CYR61- α 5 β 1 integrin loop“ regulates breast cancer cell survival and chemosensitivity through activation of ERK1/ERK2 MAPK signaling pathway. *Oncogene*. 2005;24(5):761–79.
340. Butler DE, Marlein C, Walker HF, Frame FM, Mann VM, Simms MS, u. a. Inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway activates autophagy and compensatory Ras/Raf/MEK/ERK signalling in prostate cancer. *Oncotarget [Internet]*. 22. August 2017 [zitiert 27. Februar 2019];8(34). Verfügbar unter: <http://www.oncotarget.com/fulltext/18082>

341. Persons DL, Yazlovitskaya EM, Pelling JC. Effect of extracellular signal-regulated kinase on p53 accumulation in response to cisplatin. *J Biol Chem.* 17. November 2000;275(46):35778–85.
342. Provenzano PP, Inman DR, Eliceiri KW, Keely PJ. Matrix density-induced mechanoregulation of breast cell phenotype, signaling and gene expression through a FAK–ERK linkage. *Oncogene.* Dezember 2009;28(49):4326–43.
343. Sienkiewicz P, Bielawski K, Bielawska A, Pałka J. Amidine analogue of chlorambucil is a stronger inhibitor of protein and DNA synthesis in breast cancer MCF-7 cells than is the parent drug. *European Journal of Pharmacology.* Mai 2004;492(2–3):95–101.
344. Parvani JG, Galliher-Beckley AJ, Schiemann BJ, Schiemann WP. Targeted inactivation of $\beta 1$ integrin induces $\beta 3$ integrin switching, which drives breast cancer metastasis by TGF- β . *Mol Biol Cell.* 1. November 2013;24(21):3449–59.
345. Montgomery AM, Reisfeld RA, Cheresch DA. Integrin alpha v beta 3 rescues melanoma cells from apoptosis in three-dimensional dermal collagen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 13. September 1994;91(19):8856–60.
346. Belfiore A, Malaguarnera R, Nicolosi ML, Lappano R, Ragusa M, Morrione A, u. a. A novel functional crosstalk between DDR1 and the IGF axis and its relevance for breast cancer. *Cell Adh Migr.* 23. März 2018;1–10.
347. El Azreq M-A, Kadiri M, Boisvert M, Pagé N, Tessier PA, Aoudjit F. Discoidin domain receptor 1 promotes Th17 cell migration by activating the RhoA/ROCK/MAPK/ERK signaling pathway. *Oncotarget.* 19. Juli 2016;7(29):44975–90.
348. Huang S-MA, Mishina YM, Liu S, Cheung A, Stegmeier F, Michaud GA, u. a. Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature.* Oktober 2009;461(7264):614–20.
349. Zhang K, Chen J. The regulation of integrin function by divalent cations. *Cell Adh Migr.* Februar 2012;6(1):20–9.
350. Dormond O, Ponsonnet L, Hasmim M, Foletti A, Rüegg C. Manganese-induced integrin affinity maturation promotes recruitment of $\alpha V\beta 3$ integrin to focal adhesions in endothelial cells: evidence for a role of phosphatidylinositol 3-kinase and Src. *Thrombosis and Haemostasis [Internet].* 2. Juni 2004 [zitiert 22. Mai 2017]; Verfügbar unter: http://www.schattauer.de/index.php?id=1214&doi=10.1160/TH03-11-0728&no_cache=1
351. Sharma M, Chuang WW, Sun Z. Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Stimulates Androgen Pathway through GSK3 β Inhibition and Nuclear β -Catenin Accumulation. *Journal of Biological Chemistry.* 23. August 2002;277(34):30935–41.
352. Saidak Z, Le Henaff C, Azzi S, Marty C, Da Nascimento S, Sonnet P, u. a. Wnt/ β -Catenin Signaling Mediates Osteoblast Differentiation Triggered by Peptide-induced $\alpha 5\beta 1$ Integrin Priming in Mesenchymal Skeletal Cells. *Journal of Biological Chemistry.* 13. März 2015;290(11):6903–12.
353. Woodgett JR, Voskas D, Ling LS. Does GSK-3 provide a shortcut for PI3K activation of Wnt signalling? *F1000 Biology Reports [Internet].* 24. November 2010 [zitiert 21. Februar 2019];2. Verfügbar unter: <http://www.f1000.com/reports/b/2/82>

354. Zheng H, Li W, Wang Y, Liu Z, Cai Y, Xie T, u. a. Glycogen synthase kinase-3 beta regulates Snail and β -catenin expression during Fas-induced epithelial–mesenchymal transition in gastrointestinal cancer. *European Journal of Cancer*. August 2013;49(12):2734–46.
355. Tian X, Liu Z, Niu B, Zhang J, Tan TK, Lee SR, u. a. E-Cadherin/ β -Catenin Complex and the Epithelial Barrier. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2011;2011:1–6.
356. Daugherty RL, Gottardi CJ. Phospho-regulation of β -Catenin Adhesion and Signaling Functions. *Physiology*. Oktober 2007;22(5):303–9.
357. Solzak JP, Atale RV, Hancock BA, Sinn AL, Pollok KE, Jones DR, u. a. Dual PI3K and Wnt pathway inhibition is a synergistic combination against triple negative breast cancer. *npj Breast Cancer* [Internet]. Dezember 2017 [zitiert 22. März 2019];3(1). Verfügbar unter: <http://www.nature.com/articles/s41523-017-0016-8>
358. Theile D, Staffen B, Weiss J. ATP-binding cassette transporters as pitfalls in selection of transgenic cells. *Analytical Biochemistry*. April 2010;399(2):246–50.
359. Carbonell WS, DeLay M, Jahangiri A, Park CC, Aghi MK. 1 Integrin Targeting Potentiates Antiangiogenic Therapy and Inhibits the Growth of Bevacizumab-Resistant Glioblastoma. *Cancer Research*. 15. Mai 2013;73(10):3145–54.
360. Dent P, Curiel DT, Fisher PB, Grant S. Synergistic combinations of signaling pathway inhibitors: Mechanisms for improved cancer therapy. *Drug Resistance Updates*. Juni 2009;12(3):65–73.
361. Sun Y, Sheng Z, Ma C, Tang K, Zhu R, Wu Z, u. a. Combining genomic and network characteristics for extended capability in predicting synergistic drugs for cancer. *Nature Communications* [Internet]. Dezember 2015 [zitiert 26. März 2019];6(1). Verfügbar unter: <http://www.nature.com/articles/ncomms9481>
362. Lees J, Chan A. Polypharmacy in elderly patients with cancer: clinical implications and management. *The Lancet Oncology*. Dezember 2011;12(13):1249–57.

7.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Klassifizierungs- und Therapieschema des Mammakarzinoms. Modifiziert nach Harbeck et al. (11).	5
Abbildung 2: Chemische Struktur von Mitoxantron.	13
Abbildung 3: Zyklus der Topoisomerase II vermittelten DNS-Spaltung, T-Segment-Passage und der DNS-Religation unter ATP-Verbrauch. Modifiziert nach Nitiss (75).	14
Abbildung 4: Bildung von Cisplatin DNS-Addukten. Modifiziert nach Kelland (108).	18
Abbildung 5: Schematischer Verlauf der minimal residual disease (MRD). Modifiziert nach Aguirre-Ghiso JA (121).	21
Abbildung 6: Prozess der Metastasierung. Modifiziert nach Aguirre-Ghiso JA (121).	23
Abbildung 7: Bildung primärer und sekundärer Resistenzen im Kontext der MRD. Modifiziert nach Meads et al. (140).	25
Abbildung 8: Struktureller Aufbau der Integrine und Regulierung der Bindungsaffinität und Wertigkeit (Clustern) von Integrinen. Modifiziert nach Kinashi (164).	28
Abbildung 9: Übersicht der Integrin Familie. Modifiziert nach Barczyk et al. (168).	29
Abbildung 10: Schematisch vereinfachte Darstellung des FAK-Signalweges. Modifiziert nach Guo et al. (224).	36
Abbildung 11: Schematisch vereinfachte Darstellung des canonical Wnt-Signalweges im aktiven und inaktiven Zustand. Modifiziert nach Zhan et al. (249).	40
Abbildung 12: Schematische Darstellung von Rezeptoren und nachgeschalteten Signalwegen, die eine EMT induzieren können. Modifiziert nach Lamouille et al. (284).	45
Abbildung 13: CREB-Struktur, Phosphorylierungsstellen und downstream-Zielstrukturen. Modifiziert nach Wang et al. (299).	48
Abbildung 14: Kupfer(I)-Bicinchoninsäure-Komplex.	76
Abbildung 15: Pipettierschema einer BCA-Proteinbestimmung. Exemplarisch sind drei Lysate (Lysat 1/2/3) bestimmt worden. Des Weiteren sind die Referenzen (Ref) für die Kalibriergerade und die Qualitätskontrollen (QC) aufgetragen.	77
Abbildung 16: Skizze des Proteome Profiler Array. Eingezeichnet sind die Referenz-Dots als Positivkontrolle, die PBS Negativkontrolle und Beispielwerte umrandet mit einer 2,3 mm ² Kreisfläche.	82
Abbildung 17: Absorptions- (gestrichelte Linien) und Emissionsspektren (durchgezogene Linien) von AlexaFluor405 (blau) und Fluoresceinisothiocyanat (grün), mit geringfügiger	

Überschneidung der Emissionsbereiche im Bereich zwischen 484 nm bis 551 nm. Die Graphik entstammt dem „Fluorescence SpectraViewer“ von ThermoFisher (326).....	84
Abbildung 18: Reduktion von MTT zu Formazan.	87
Abbildung 19: Beispielhafte Aufteilung eines MTT-Assay. Gezeigt ist die Zugabe der logarithmischen Verdünnungsreihe von CDDP. Beginnend mit DPBS als 0 Wert und endend mit Stammlösung (SL). Die äußerste Plattenreihe enthält den Verdunstungsschutz aus DPBS.	88
Abbildung 20: Monooxygenierung von Luciferin durch die Firefly Luciferase in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff, Magnesium-Ionen und ATP zur Erzeugung von Chemilumineszenz.	92
Abbildung 21: im Cignal TCF/LEF Reporter Assay Kit (LUC) enthaltene Vektoren.	95
Abbildung 22: Bestimmung der Transfektionseffizienz mittels fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen; links) GFP Fluoreszenz der transfizierten Zellen nach 24 h; rechts) Transfizierte und untransfizierte Zellen als Überlappung aus Fluoreszenz- und Durchlichtmikroskopie.	96
Abbildung 23: Minimal-, Optimal- und Maximaldosis bei Inkubation mit Puromycin von MCF-7-Zellen vor viraler Transduktion, nach drei Tagen (Viereck) und nach sieben Tagen (Kreis). ...	99
Abbildung 24: Optimal-, Höchst- und Maximaldosis bei Inkubation mit Puromycin von MCF-7 Zellen nach viraler Transduktion, nach drei Tagen (Viereck) und nach sieben Tagen (Kreis); zusätzlich eingezeichnet die Wt Dosis (Optimaldosis vor der Transfektion).	100
Abbildung 25: Westernblot zur Überprüfung des erfolgreichen knock-downs von $\beta 1$ -Integrinen in MCF-7-Zellen; gezeigt sind die MCF-7-sc (sc) und die MCF-7-kd ($\beta 1$ -kd).....	101
Abbildung 26: Resistenzbildung in MV3-Zellen nach CAM-DR Initiierung mit Mn^{2+} [1 mM], auf Kollagen und mit der Kombination beider Behandlungen unter CDDP nach 72 h Inkubationszeit. Aus Piva et al. (331).....	103
Abbildung 27: Phosphokinasen des Wnt-Signalweges; gezeigt sind unbehandelte MCF-7-Zellen (weiß), MCF-7-Zellen auf Kollagen gewachsen ohne MX (blau) und auf Kollagen mit MX [262 nM] (blau/diagonalgestreift), sowie MCF-7- $\beta 1$ -kd auf Kollagen mit MX [262 nM] (grün/diagonalgestreift) nach 72 h Inkubationszeit.....	105
Abbildung 28: Phosphokinasen des PI3Kinase-/Akt-Signalweges; gezeigt sind unbehandelte MCF-7-Zellen (weiß), MCF-7-Zellen auf Kollagen gewachsen ohne MX (blau) und auf Kollagen mit MX [262 nM] (blau/diagonalgestreift), sowie MCF-7- $\beta 1$ -kd auf Kollagen mit MX [262 nM] (grün/diagonalgestreift) nach 72 h Inkubationszeit.....	106
Abbildung 29: Phosphokinasen des MAPK-Signalweges; gezeigt sind unbehandelte MCF-7-Zellen (weiß), MCF-7-Zellen auf Kollagen gewachsen ohne MX (blau) und auf Kollagen mit MX [262 nM] (blau/diagonalgestreift), sowie MCF-7- $\beta 1$ -kd auf Kollagen mit MX [262 nM] (grün/diagonalgestreift) nach 72 h Inkubationszeit.....	108
Abbildung 30: Phosphokinasen des STAT-Signalweges; gezeigt sind unbehandelte MCF-7-Zellen (weiß), MCF-7-Zellen auf Kollagen gewachsen ohne MX (blau) und auf Kollagen mit MX	

[262 nM] (blau/diagonalgestreift), sowie MCF-7- β 1-kd auf Kollagen mit MX [262 nM] (grün/diagonalgestreift) nach 72 h Inkubationszeit. 110

Abbildung 31: Weitere untersuchte Phosphokinasen; gezeigt sind unbehandelte MCF-7-Zellen (weiß), MCF-7-Zellen auf Kollagen gewachsen ohne MX (blau) und auf Kollagen mit MX [262 nM] (blau/diagonalgestreift), sowie MCF-7- β 1-kd auf Kollagen mit MX [262 nM] (grün/diagonalgestreift) nach 72 h Inkubationszeit. 111

Abbildung 32: Durchflusszytometrische Bestimmung der Schlüsselproteine des Wnt-Signalweges (pGSK3- β , β -Catenin und Axin); gezeigt sind unbehandelte MCF-7-Zellen (weiß), MCF-7-Zellen mit Mn^{2+} [1 mM] vorinkubiert (rosa) und MCF-7-Zellen auf Kollagen gewachsen (blau); Zusatz von CDDP [22 μ M] nach 72 h Inkubationszeit..... 113

Abbildung 33: Durchflusszytometrische Bestimmung der Schlüsselproteine des Wnt-Signalweges (pGSK3- β , β -Catenin und Axin); gezeigt sind unbehandelte MCF-7-Zellen (weiß), MCF-7-Zellen mit Mn^{2+} [1 mM] vorinkubiert (rosa) und MCF-7-Zellen auf Kollagen gewachsen (blau); Zusatz von MX [262 nM]. 113

Abbildung 34: A) Westernblot von β -Catenin nach der Behandlung der MCF-7-Zellen mit MX [262 nM] mit Mn^{2+} [1 mM], Kollagen und der Kombination beider Behandlungen nach 72 h Inkubationszeit; gezeigt ist die Gesamtexpression (β -Catenin) und die Verteilung in zytosolischer (Zytosol) und nukleärer (Nukleus) Fraktion **B)** Pixeldichtenanalyse des Gesamt- β -Catenin aus **A** von MCF-7-Zellen unbehandelt (weiß), mit Mn^{2+} [1 mM] (rosa), Kollagen (blau) und der Kombination (schwarz) behandelt und mit MX [262 nM] versetzt nach 72 h Inkubationszeit. .. 114

Abbildung 35: A) Westernblot der pGSK3- β nach der Behandlung der MCF-7-Zellen mit MX [262 nM] mit Mn^{2+} [1 mM], Kollagen und der Kombination beider Behandlungen nach 72 h Inkubationszeit **B)** Pixeldichten Analyse der Westernblots aus **A** MCF-7-Zellen unbehandelt (weiß), mit Mn^{2+} [1 mM] (rosa), Kollagen (blau) und der Kombination (schwarz) behandelt und mit MX [262 nM] versetzt..... 115

Abbildung 36: TOPflash-Assay in MCF-7-Zellen; gezeigt ist die Lumineszenz unbehandelter (weiß) MCF-7-Zellen (MCF-7-Wt), mit Mn^{2+} [1 mM] vorinkubiert (rosa), auf Kollagen kultiviert (blau) oder Kollagen plus Mn^{2+} (schwarz); zusätzlich LiCl [50 mM] (orange) als Wnt-Aktivator. Die assayinternen Positiv- (hellgrün) und Negativkontrollen (rot) sind ebenfalls abgebildet. Neben den unbehandelten Ansätzen (ohne Muster) wurden die Zellen für 72 h mit MX [262 nM] (diagonalgestreift) und CDDP [22 μ M] (längsgestreift) inkubiert. 116

Abbildung 37: Durchflusszytometrische Bestimmung von E-Cadherin; gezeigt sind unbehandelte MCF-7-Zellen (weiß), MCF-7-Zellen mit Mn^{2+} vorinkubiert (rosa) und MCF-7-Zellen auf Kollagen gewachsen (blau); Zusatz von CDDP [22 μ M] (längsgestreift) und Zusatz von MX [262 nM] (diagonalgestreift) nach 72 h Inkubationszeit. 118

Abbildung 38: Inhibition der FAK und PI3K in MCF-7-Zellen mittels FAK14 [1 μ M] und BEZ235 [1 nM]. Gezeigt sind in Blau die mit MX [262 nM] inkubierten Zellen ohne Zusätze (CTR), auf Kollagen gewachsen (COL1), mit FAK Inhibitor (FAK14), mit FAK Inhibitor auf Kollagen (FAK14 + COL1), mit PI3K Inhibitor (BEZ235 1 nM) und mit PI3K Inhibitor auf Kollagen (BEZ235 1 nM + COL1). In Gelb sind die analogen Zusätze unter CDDP [22 μ M] gezeigt. Die Daten wurden freundlicherweise von Herrn Fabian Baltes zur Verfügung gestellt und modifiziert nach Jakubzig et al. (332). 121

Abbildung 39: MCF-7-sc auf Kollagen Typ I nach 72 h Inkubationszeit.	123
Abbildung 40: MCF-7- β 1-kd-Zellen auf Kollagen Typ I nach 72 h Inkubationszeit.....	124
Abbildung 41: Westernblot des β 1-Integrins in MCF-7-sc und MCF-7- β 1-kd transfiziert an Tag 1 und an Tag 2.....	125
Abbildung 42: Pixeldichten Analyse des Westernblots aus Abbildung 41 in MCF-7-sc- und MCF-7- β 1-kd-Zellen von Tag 1.	125
Abbildung 43: Exemplarische Messung der Zytotoxizität von CDDP und MX mit 2000 Zellen über 72 h Inkubationszeit im Vergleich MCF-7-sc- (lila) und MCF-7- β 1-kd-Zellen (grün).....	126
Abbildung 44: Graph der Zytotoxizität von CDDP und MX mit 2000 Zellen über 72 h Inkubationszeit. Dargestellt sind die gemittelten RF-Werte der in Abbildung 43 exemplarisch gezeigten Replikate, normalisiert auf die MCF-7-sc-Zellen.	127
Abbildung 45: Exemplarische Messung der Zytotoxizität von CDDP und MX mit 2000 Zellen über 72 h Inkubationszeit auf Kollagen im Vergleich MCF-7-sc (lila) und MCF-7- β 1-kd Zellen (grün).	128
Abbildung 46: Graph der Zytotoxizität von CDDP und MX mit 2000 Zellen über 72 h Inkubationszeit auf Kollagen. Dargestellt sind die gemittelten RF-Werte der in Abbildung 45 exemplarisch gezeigten Replikate, normalisiert auf die MCF-7-sc-Zellen.....	129
Abbildung 47: Zytotoxizität von CDDP und MX mit 2000 Zellen nach Vorinkubation mit Mangan im Vergleich MCF-7-sc- (lila) und MCF-7- β 1-kd-Zellen (grün).	130
Abbildung 48: Graph der Zytotoxizität von CDDP mit 2000 Zellen nach Vorinkubation mit Mangan. Dargestellt sind die gemittelten und normalisierten RF-Werte der in Abbildung 47 exemplarisch gezeigten Replikate, normalisiert auf die MCF-7-sc-Zellen.....	130
Abbildung 49: Exemplarische Messung der Zytotoxizität von CDDP und MX mit 2000 Zellen über 72 h Inkubationszeit mit FAK14 und mit FAK14 auf Kollagen im Vergleich MCF-7-sc- (lila) und MCF-7- β 1-kd-Zellen (grün).	132
Abbildung 50: A) Westernblot der pCREB nach der Behandlung ohne und mit MX [262 nM]; unstimuliert, stimuliert mit Mn^{2+} [1 mM], Kollagen und der Kombination beider B) Pixeldichtenanalyse des Westernblot aus A; dargestellt sind MCF-7-Zellen ohne MX und mit MX- (diagonalgestreift) Inkubation [262 nM], auf Kollagen (blau), mit Mn^{2+} (rosa) und der Kombination (schwarz) nach 72 h Inkubationszeit.....	136
Abbildung 51: A) Westernblot der ERK1/2 nach der Behandlung mit und ohne MX [262 nM]; unstimuliert oder stimuliert mit Mn^{2+} [1 mM], Kollagen und der Kombination beider. Die obere der gezeigten Banden repräsentiert ERK1, die untere ERK2. B) Pixeldichtenanalyse des Westernblot aus A; dargestellt sind MCF-7-Zellen ohne MX- und mit MX- (diagonalgestreift) Inkubation [262 nM], auf Kollagen (blau), mit Mn^{2+} [1 mM] (rosa) und der Kombination (schwarz) nach 72 h Inkubationszeit.....	137
Abbildung 52: A) Westernblot der pERK1/2 nach der Behandlung mit und ohne MX [262 nM]; unstimuliert oder stimuliert mit Mn^{2+} [1 mM], Kollagen und der Kombination beider. Die obere	

der gezeigten Banden repräsentiert pERK1, die untere pERK2. **B)** Pixeldichtenanalyse des Westernblot aus **A**; dargestellt sind MCF-7-Zellen ohne MX- und mit MX- (diagonalgestreift) Inkubation auf Kollagen (blau), mit Mn^{2+} [1 mM] (rosa) und der Kombination (schwarz) nach 72 h Inkubationszeit. 138

Abbildung 53: Quotienten der Pixeldichtenanalysen von pERK und ERK aus Abbildung 51 und Abbildung 52. Dargestellt sind MCF-7-Zellen ohne MX- und mit MX- (diagonalgestreift) Inkubation auf Kollagen (blau), mit Mn^{2+} [1 mM] (rosa) und der Kombination (schwarz) nach 72 h Inkubationszeit. 139

Abbildung 54: **A)** Westernblot der pMEK1/2 nach der Behandlung mit und ohne MX [262 nM] unstimuliert oder stimuliert mit Mn^{2+} [1 mM], Kollagen und der Kombination beider **B)** Pixeldichtenanalyse des Westernblot aus **A**; dargestellt sind MCF-7-Zellen ohne MX- und mit MX- (diagonalgestreift) Inkubation [262 nM], auf Kollagen (blau), mit Mn^{2+} [1 mM] (rosa) und der Kombination (schwarz) nach 72 h Inkubationszeit. 140

Abbildung 55: **A)** Westernblot der pCREB nach der Behandlung mit und ohne MX [262 nM] in MCF-7-sc und MCF-7- β 1-kd Zellen **B)** Pixeldichtenanalyse des Westernblot aus **A** dargestellt sind MCF-7-sc (lila) und MCF-7- β 1-kd (grün) ohne und mit MX [262 nM] (diagonalgestreift) nach 72 h Inkubationszeit. 141

Abbildung 56: **A)** Westernblot der ERK1/2 nach der Behandlung mit und ohne MX [262 nM] in MCF-7-sc- und MCF-7- β 1-kd-Zellen **B)** Pixeldichtenanalyse des Westernblot aus **A** dargestellt sind MCF-7-sc (lila) und MCF-7- β 1-kd (grün) ohne und mit MX [262 nM] (diagonalgestreift) nach 72 h Inkubationszeit. 142

Abbildung 57: **A)** Westernblot der pERK1/2 nach der Behandlung mit und ohne MX [262 nM] in MCF-7-sc- und MCF-7- β 1-kd-Zellen **B)** Pixeldichtenanalyse des Westernblot aus **A**; dargestellt sind MCF-7-sc (lila) und MCF-7- β 1-kd (grün) ohne und mit MX [262 nM] (diagonalgestreift) nach 72 h Inkubationszeit. 143

Abbildung 58: Quotient der Pixeldichtenanalysen von pERK und ERK aus Abbildung 56 und Abbildung 57. Dargestellt sind MCF-7-sc (lila) und MCF-7- β 1-kd (grün) ohne und mit MX [262 nM] (diagonalgestreift) nach 72 h Inkubationszeit. 144

Abbildung 59: **A)** Westernblot der pMEK1/2 nach der Behandlung mit und ohne MX [262 nM] in MCF-7-sc- und MCF-7- β 1-kd-Zellen **B)** Pixeldichtenanalyse des Westernblot aus **A** dargestellt sind MCF-7-sc (lila) und MCF-7- β 1-kd (grün) ohne und mit MX [262 nM] (diagonalgestreift) nach 72 h Inkubationszeit. 145

Abbildung 60: Dargestellt ist der Effekt der Behandlung in [%], also die verbleibende Vitalität der MCF-7- β 1-kd- (grün) gegenüber den MCF-7-sc-Zellen (lila) unter **A)** CDDP und **B)** MX mit den jeweiligen Inkubationsansätzen. Beide Zelllinien wurden entweder mit dem MEK-Inhibitor U0126 [5 μ M], dem ERK-Inhibitor SCH772948 [250 nM], oder dem CREB-Inhibitor 666-15 [100 nM], alleine, oder in Kombination mit Kollagen inkubiert. Die Daten wurden freundlicherweise von Herrn Fabian Baltes für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. 149

Abbildung 61: Mechanistische Kompensation der β 1 gesteuerten Resistenzbildung im Grundzustand (oben), sowie nach Manipulation der β 1-Untereinheit (unten). 154

Abbildung 62: Exemplarische Messung der Zytotoxizität von IWR1 [10 µM] mit 10.000 Zellen über 72 h Inkubationszeit auf Kollagen im Vergleich MV3-Zellen ohne IWR1 (blau) und mit IWR1 (schwarz).	156
Abbildung 63: Graph der Zytotoxizität von IWR1 mit 10.000 Zellen über 72 h Inkubationszeit auf Kollagen. Dargestellt sind die gemittelten und normalisierten RF-Werte, der in Abbildung 62 exemplarisch gezeigten Replikate. MV3-Zellen auf Kollagen ohne IWR1 (blau) und auf Kollagen mit IWR1 (blau kariert).	157
Abbildung 64: Durchflusszytometrische Bestimmung der Schlüsselproteine des Wnt-Signalweges (pGSK3-β, β-Catenin und Axin); gezeigt sind unbehandelte MV3-Zellen (weiß), MV3-Zellen mit Mn ²⁺ [1 mM] vorinkubiert (rosa) und MV3-Zellen auf Kollagen gewachsen (blau) nach 72 h Inkubationszeit.	158
Abbildung 65: Durchflusszytometrische Bestimmung der Schlüsselproteine des Wnt-Signalweges (pGSK3-β, β-Catenin und Axin) in MV3 Zellen unter Zusatz von CDDP [7,5 µM] ohne weitere Behandlung (weiß), Vorinkubation mit Mn ²⁺ [1 mM] (rosa), MV3-Zellen auf Kollagen gewachsen (blau) oder die Kombination von Mn ²⁺ und Kollagen (schwarz) nach 72 h Inkubationszeit.....	159
Abbildung 66: Westernblot der pGSK3-β und β-Catenin nach der Behandlung der MV3-Zellen mit CDDP [7,5 µM] mit Mn ²⁺ [1 mM], Kollagen und der Kombination beider Behandlungen nach 72 h Inkubationszeit. Zusätzlich ist GAPDH als housekeeping Protein angegeben.	160
Abbildung 67: Lokalisation von β-Catenin in nur mit CDDP behandelten (weiß) und mit Mn ²⁺ [1 mM] und CDDP-behandelten [7,5 µM] (rosa) MV3-Zellen nach 72 h Inkubationszeit.	160
Abbildung 68: Durchflusszytometrische Bestimmung von E-Cadherin; gezeigt sind unbehandelte MV3-Zellen (weiß), MV3-Zellen mit Mn ²⁺ [1 mM] vorinkubiert (rosa), MV3-Zellen auf Kollagen gewachsen (blau) und die Kombination beider Behandlungen (schwarz); Zusatz von CDDP [7,5 µM].	161
Abbildung 69: TOPflash-Assay der MV3-Melanomzellen; gezeigt sind unbehandelte MV3-Zellen (weiß), MV3-Zellen mit Mn ²⁺ vorinkubiert (rosa), MV3-Zellen auf Kollagen gewachsen (blau) und die Kombination beider Behandlungen (schwarz); Zusatz von CDDP [2 µM].....	162
Abbildung 70: Vernetzung der an der integrinvermittelten Resistenzbildung beteiligten Signalwege. In Rot (1) dargestellt der PI3K/Akt-Signalweg, in Grün (2) der kanonische Wnt-Signalweg und in Blau (3) die E-Cadherin vermittelte β-Catenin Freisetzung. Aus Piva et al. (331).	165
Abbildung 71: Modellmechanismen der über die Phosphorylierung an Ser 9 der GSK3-β vermittelten Beeinflussung des Wnt-Signalweges. Unter 1 dargestellt ist die Verarmung der Zelle an aktiver GSK3-β und dadurch indirekter Inhibition des destruction complexes. Unter 2 ist die Beeinflussung der E-Cadherin Expression über Veränderungen auf Transkriptionsebene gezeigt und unter 3 die Vermittlung von β-Catenin/E-Cadherin-Bindungen über die GSK3-β. Die roten Markierungen (Pfeil und Kreuze) zeigen dabei ein Ausbleiben der Interaktion an, während der grüne Pfeil eine steigende Wirkung anzeigt.	168

Abbildung 72: Durchflusszytometrische Bestimmung der Schlüsselproteine des Wnt-Signalweges (pGSK3- β , β -Catenin und Axin); gezeigt sind unbehandelte MV3- β 1-kd-Zellen (weiß), MV3- β 1-kd-Zellen mit Mn^{2+} [1 mM] vorinkubiert (rosa) und MV3- β 1-kd-Zellen auf Kollagen gewachsen (blau); Zusatz von CDDP [7,5 μ M] (längsgestreift) nach 72 h Inkubationszeit.	171
Abbildung 73: Durchflusszytometrische Bestimmung der Schlüsselproteine des Wnt-Signalweges (pGSK3- β , β -Catenin und Axin); gezeigt sind unbehandelte MV3-sc-Zellen (weiß), MV3-sc-Zellen mit Mn^{2+} [1 mM] vorinkubiert (rosa) und MV3-sc-Zellen auf Kollagen gewachsen (blau); Zusatz von CDDP [7,5 μ M] (längsgestreift) nach 72 h Inkubationszeit.	172
Abbildung 74: Direkter Vergleich der β 1-vermittelten Signaleinflüsse in den MV3- und MCF-7-Zellen mit und ohne intakter β 1-Untereinheit.	177

7.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Inkubationsbedingungen der Lysatpräparationen für den Proteome Profiler™ Human Phospho-Kinase Array.	81
Tabelle 2: Logarithmische Verdünnungsreihe Cisplatin aufsteigend von links nach rechts.....	88
Tabelle 3: Logarithmische Verdünnungsreihe Mitoxantron aufsteigend von links nach rechts.	89
Tabelle 4: Inkubationszeitraum und resultierende Endkonzentrationen der verwendeten Inhibitoren im MTT Assay.	89
Tabelle 5: Inkubationsschema der Proben für den MV3 TOPflash-Assay.	93
Tabelle 6: Beispielhafte Normalisierung einer TOPflash – Assay Messung.	94
Tabelle 7: Inkubationsschema der Proben für den MCF-7 TOPflash-Assay.	96
Tabelle 8: Übersicht der Zytotoxizität der verwendeten Zytostatika CDDP und MX mit 2000 Zellen über 72 h Inkubationszeitraum und die daraus resultierenden Resistenzfaktoren.	126
Tabelle 9: Übersicht der Zytotoxizität der verwendeten Zytostatika CDDP und MX mit 2000 Zellen nach 72 h Inkubationszeitraum auf Kollagen und die daraus resultierenden Resistenzfaktoren. Zusätzlich sind die nur mit dem Zytostatikum behandelten Kontrollen (Ø) aufgetragen.....	127
Tabelle 10: Übersicht der Zytotoxizität der verwendeten Zytostatika CDDP und MX mit 2000 Zellen nach fünf-minütiger Vorinkubation mit Mn^{2+} [1 mM] und die daraus resultierenden Resistenzfaktoren. Zusätzlich sind die nur mit dem Zytostatikum behandelten Kontrollen (Ø) aufgetragen.....	129
Tabelle 11: Übersicht der Zytotoxizität der verwendeten Zytostatika CDDP und MX mit 2000 Zellen nach 24 h Inkubationszeitraum mit FAK14 [1 μ M] und die daraus resultierenden Resistenzfaktoren. Des Weiteren wurde derselbe Ansatz auf Kollagen ausgesät und ebenfalls mit FAK14 [1 μ M] behandelt (Kollagen + FAK14). Zusätzlich sind die nur mit dem Zytostatikum behandelten Kontrollen (Ø) und die nur auf Kollagen gewachsenen Kontrollen (Kollagen) aufgetragen.....	131
Tabelle 12: Übersicht der Zytotoxizität des Wnt-Inhibitors IWR1; 10.000 Zellen inkubiert auf Kollagen über 72 h Inkubationszeitraum und der daraus resultierende Resistenzfaktor.	156

7.4. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich als erstes meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Gerd Bendas, für die Möglichkeit in seinem Arbeitskreis zu arbeiten und zu promovieren danken, sowie für sein in mich gesetztes Vertrauen bei der Erforschung der Thematik dieser Doktorarbeit. Die stets kollegiale, konstruktive und kommunikative Arbeitsweise und das freundschaftliche Miteinander habe ich immer sehr zu schätzen gewusst.

Für die Übernahme der Tätigkeit als Zweitgutachter möchte ich Frau PD Dr. Gana Staal danken. Darüber hinaus möchte ich ihr und Herrn Prof. Dr. Ulrich Jaehde für die kollegiale Zusammenarbeit zwischen ihrem und unserem Arbeitskreis danken.

Frau Prof. Dr. König und Herrn Prof. Dr. Haas möchte ich dafür danken, dass sie sich bereit erklärt haben als Mitglieder der Prüfungskommission zu fungieren.

Frau PD Dr. Anke Schiedel danke ich für ihre kompetente Unterstützung bei Fragen rund um das Thema Transfektion/Transduktion.

Dem Bonner *International Graduate School of Drug Science* (BIGS) möchte ich für die finanzielle Unterstützung danken, die es mir ermöglicht hat, an der Konferenz 2017 in Spetses (Griechenland) teilzunehmen.

Ein besonderer Dank gilt all meinen Kollegen und Kolleginnen aus dem Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Bendas, die mir über die Jahre nicht nur Kollegen waren, sondern auch gute Freunde geworden sind. Darunter möchte ich mich insbesondere bei Frau Bethania Piva und Herrn Fabian Baltes bedanken, die mit mir gemeinsam viel Zeit und Mühe investiert haben, um den zugrunde liegenden Phänomenen der CAM-DR auf die Spur zu kommen. Auch Frau Svenja Henze möchte ich für ihre Hilfe und die erfolgreiche Zusammenarbeit danken. Allen anderen Mitgliedern des Arbeitskreises gilt ebenfalls mein Dank für die vielen Kleinigkeiten, die das Arbeiten miteinander zu so einer schönen Zeit gemacht haben und für ihre Hilfe, wann immer ich sie brauchte. Dazu zählen natürlich auch alle ehemaligen Arbeitskollegen, von denen ich während der gemeinsamen Zeit viel lernen durfte.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen technischen Assistenten, darunter insbesondere bei Herrn Baumert und Frau Jusen, für die hervorragende Zusammenarbeit.

Für das sorgfältige und gewissenhafte Korrekturlesen dieser Arbeit möchte ich Svenja Schwarz, Wiebke Schirdewahn und insbesondere Rita Waldukat danken.

Ein weiterer Dank geht an die Assistenten des ersten Semesters, sowie die verschiedenen Praktikumsleiter, für die unterhaltsame und angenehme Zusammenarbeit bei der Betreuung der Studenten.

Mein ganz persönlicher Dank richtet sich an meine Familie und ganz besonders meine lieben Eltern Cosima und Andreas Jakubzig, die mich jederzeit unterstützt haben in all meinen Bestrebungen. Zu guter Letzt danke ich meiner Freundin Rita für die wundervolle gemeinsame Zeit, in der sie immer an mich geglaubt hat und dafür, dass sie immer für mich da ist.

7.5. **Puplikationen und Posterbeiträge**

Puplikationen

Jakubzig B*, Baltes F*, Henze S, Schlesinger M, Bendas G.

Mechanisms of Matrix-Induced Chemoresistance of Breast Cancer Cells-Deciphering Novel Potential Targets for a Cell Sensitization.

Cancers (Basel). 2018 Dec 6;10(12). pii: E495. doi: 10.3390/cancers10120495.

Piva MBR*, Jakubzig B*, Bendas G.

Integrin Activation Contributes to Lower Cisplatin Sensitivity in MV3 Melanoma Cells by Inducing the Wnt Signalling Pathway

Cancers (Basel). 2017 Sep 16;9(9). pii: E125. doi: 10.3390/cancers9090125.

Ross T*, Jakubzig B*, Grundmann M, Massing U, Kostenis E, Schlesinger M, Bendas G.

The molecular mechanism by which saturated lysophosphatidylcholine attenuates the metastatic capacity of melanoma cells.

FEBS Open Bio. 2016 Nov 24;6(12):1297-1309. doi: 10.1002/2211-5463.12152.

Ross T, Heuter S, Schlesinger M, Jakubzig B, Raynor A, Massing U, Bendas G.

Lysophosphatidylcholine attenuates melanoma cell adhesion and migration dependent on the degree of fatty acid saturation.

Int J Clin Pharmacol Ther. 2015 Dec;53(12):1049-51. doi: 10.5414/CPXCES14EA05.

Gerber U, Hoß SG, Shteingauz A, Jüngel E, Jakubzig B, Ilan N, Blaheta R, Schlesinger M, Vlodavsky I, Bendas G.

Latent heparanase facilitates VLA-4-mediated melanoma cell binding and emerges as a relevant target of heparin in the interference with metastatic progression.

Semin Thromb Hemost. 2015 Mar;41(2):244-54. doi: 10.1055/s-0035-1544229.

* geteilte Erstautorenschaft

Posterbeiträge

Jakubzig B, Bendas G.

Does Integrin activation by ECM substrates like collagen and/or manganese trigger Wnt signalling and therefore lead to a loss in chemosensitivity?

EACR-FEBS Advanced Lecture Course, Spetses 2017

Pfankuchen, D. B., Stölting, D. P., Jakubzig, B., Royer, H.-D., Bendas, G.

Low molecular weight heparin can overcome cisplatin resistance in ovarian cancer cells- is the wnt-pathway the crucial target of heparin?

Wnt meeting 2016, EMBO Conference, Brunn (Tschechien) 2016

Jakubzig B, Ross T, Schlesinger M, Bendas G.

Are the antimetastatic properties of Lysophosphatidylcholine (LysoPC) based on a deregulation of Protein kinase C (PKC) activity and/or intracellular calcium levels?

Caesar Jahrestagung, Innsbruck 2015

Hoß SG, Gerber U, Jakubzig B, Schlesinger M, Ilan N, Vlodavsky I, Bendas G.

The impact of latent heparanase on integrin-mediated adhesion and migration of melanoma cells in metastatic spread - A novel target for therapeutic interference?

DPhG Jahrestagung, Frankfurt am Main 2014